E84
cs47

Ano 1942

Tomo 37

Fascículo 1

MEMÓRIAS
DO
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Rio de Janeiro - Brasil

IMPRENSA NACIONAL
RIO DE JANEIRO — 1942

ÍNDICE

Tomo 37 Ano 1942 Fascículo 1

ROMAÑA, CECILIO e DIAS, EMMANUEL — Reação de fixação do complemento na Doença de Chagas, com antigeno alcoólico de cultura do *Schizotrypanum Cruzi* 1

SOUZA-ARAUJO, H. C. de — Os bacilos de Hansen e de Stefansky. Contribuição para a sua morfologia 11

ROMAÑA, C. e MEYER, H. — Estudo do ciclo evolutivo do *Schizotrypanum Cruzi* em cultura de tecidos de embrião de galinha 19

SOUZA-ARAUJO, H. C. de — Cultura cromogênica dum bacilo acido-alcool resistente isolado de lesão fechada de lepra humana 29

CUNHA, A. M. da — A sôro-aglutinação das Leishmanias 35

RODRIGUES, BICHAT DE ALMEIDA E BRITO MELO, GERVASIO de — Contribuição ao estudo da Tripanosomiase Americana 77

As **MEMÓRIAS,** orgão oficial do Instituto Oswaldo Cruz, editadas sob a direção do Dr. H. C. de Souza-Araujo, são reservadas, exclusivamente, à publicação de trabalhos nele realizados, e aparecerão em fascículos, em Março, Junho, Setembro e Dezembro.

Toda a correspondência deverá ser dirigida à:

REDAÇÃO DAS MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ
CAIXA POSTAL 926 — ENDEREÇO TELEGRÁFICO: "MANGUINHOS", RIO
RIO DE JANEIRO — BRASIL

MEMORIAS
DO
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Tomo 37 Ano — 1942 Fascículo 1

Reação de fixação do complemento na Doença de Chagas, com antígeno alcoólico de cultura do "Schizotrypanum cruzi" *

por

Cecilio Romaña e Emmanuel Dias

A aplicação da reação de Bordet-Gengou ao diagnóstico da doença de Chagas tem sido praticada por diversos autores com resultados às vezes satisfatórios, porem nem sempre concordantes, devido principalmente ao fato de não trabalharem com antigenos que, alem de possuirem as qualidades indispensaveis a esses reativos, fossem suficientemente estaveis e rigorosamente padronizaveis.

Na presente nota descrevemos o preparo de um antígeno alcoólico dotado destas qualidades, feito com culturas do *Schizotrypanum cruzi*, e relatamos os resultados das primeiras reações com ele ensaiadas.

Inicialmente, passaremos em revista os diferentes antígenos que até agora teem sido utilizados na reação.

Guerreiro & Machado (1913), os primeiros a estudar a questão, experimentarem três antígenos. Um deles era feito com tripanosomas do sangue de animal infectado, separados por centrifugação, lavados e emulsionados

* Recebido para publicação a 31 de dezembro de 1941 e dado à publicidade em abril de 1942.

Trabalho do Serviço de Estudo das Grandes Endemias do Instituto Oswaldo Cruz (Manguinhos) — Superintendente interino: Professor Carlos Chagas Filho.

em soro fisiológico. Como oferecesse dificuldade a obtenção de grande quantidade de parasitos do sangue, resolveram utilizar-se do baço de cães jovens infectados, com o qual prepararam antígenos aquosos e antígenos glicerinados, sendo estes tratados previamente pelo álcool e suspenso o depósito dissecado em água fisiológica. Destes três reativos, o que melhores resultados proporcionou foi o antígeno aquoso de baço.

Cunha & Villela (1919) trabalharam com extratos aquosos de orgãos de animais infectados (coração, baço e cérebro de cão, coração de cobaia), obtendo bons resultados com alguns e relacionando a atividade do antígeno com a riqueza, em parasitos, do orgão empregado. Observaram estrita especificidade dos extratos ativos, mas comprovaram a sua labilidade, expressa pela rápida queda do poder fixador e aumento do poder impediente.

Leão (citado por Villela & Bicalho, 1923) trabalhou com coração e baço de cães doentes, preparando extratos alcoólicos, que não julgou utilizaveis, e extratos aquosos, cuja instabilidade tambem verificou. Sugeriu, para afastar este inconveniente, o preparo de antígeno aquoso no momento do uso, com baço dissecado, pulverizado e guardado em baixa temperatura.

Assinalando as desvantagens dos extratos aquosos de orgãos, Villela & Bicalho (1923) propuseram o preparo de antígenos glicerinados mistos, de baço e coração de cães infectados, assim constituidos: polpa de orgãos, 1 parte, água distilada, 2 partes, glicerina 1 parte, fenol 0,5%. Obtiveram "ótimos resultados" nas reações, mostrando-se o antígeno utilizavel até pelo menos 4 meses depois de preparado.

Lacorte (1926) conseguiu melhores resultados com antígenos glicerinados de baço de cão novo infectado, do que com antígenos glicerinados de baço e coração. Não obteve a mesma durabilidade que Villela & Bicalho conseguiram, aparecendo regularmente a ação impediente entre 15 e 30 dias.

Ortiz Patto (1930) fez ensaios no bócio endêmico com antígenos glicerinados feitos com orgãos infectados e com antígenos metílicos (orgão fresco moido, 1 parte, álcool metílico, 2 partes; maceração na estufa, 5 dias; diluição 1/3 e 1/5 em água fisiológica), sendo estes "bastante estaveis e desprovidos de ações proteotrópicas e hemolíticas".

Trabalhando com o antígeno de Watson (*Trypanosoma equiperdum*), Julio Muniz (1930) obteve vários resultados positivos em casos comprovados ou suspeitos de doença de Chagas, bem como em casos de leishmaniose cutânea, e resultados negativos em sifilíticos com Wassermann fortemente positivo. O antígeno é, porem, de preparo trabalhoso e só é utilizavel no mesmo

dia ou no máximo no dia seguinte ao de sua confecção. Ensaiando antígenos constituidos por emulsão de culturas ricas de *S. cruzi* em meio N.N.N. e em Noguchi, verificou-os desprovidos de qualquer ação fixadora.

Minning (1935) empregou na reação extratos glicerinados de orgãos de cães infectados com amostra brasileira de *S. cruzi*, preparados segundo a técnica de Villela & Bicalho (1923). Os extratos de baço revelaram maior poder fixador do que os de músculo, coração e fígado. Com os antígenos de baço, este autor obteve resultados positivos com muitos soros de pacientes sofrendo das mais diversas doenças ou condições, como sífilis, anemia perniciosa, hipotireoidismo, verminose, gravidez, período *post-partum*, bem como com soros de animais infectados com *Trypanosoma gambiense* e *Treponema pallidum* — daí concluindo pela inteira inespecificidade da reação de Guerreiro-Machado. Entretanto, diversas restrições podem ser postas quanto às condições em que foi dado a Minning trabalhar, as quais impedem a aceitação imediata de sua conclusão.

No esquema da reação principal utilizado por Minning (quadro 2, p. 318), não figura um indispensavel tubo testemunha do poder impediente do soro em presença da menor dose de complemento empregada (0,8cm³ da diluição a 1/15). Conquanto refira que o poder fixador de seus antígenos não diminuiu em 5 meses de observação, Minning nada refere quanto a possiveis variações do poder impediente, no decorrer deste tempo; nos 17 antígenos com que trabalhou, Lacorte (1926) verificou sempre o aparecimento de impediência 15 a 30 dias depois da preparação. Os unicos soros de que Minning dispunha para controle da atividade fixadora específica de seus extratos eram apenas os de 4 cães infectados com *S. cruzi*. Ora, tanto Cunha & Villela (1919), como Villela & Bicalho (1923), já tinham insistido em que o soro deste animal é dificilmente utilizavel na reação, pela frequência com que se torna impediente, sendo que "no pequeno número de reações aproveitaveis o resultado não foi concludente" (Villela & Bicalho 1923, pág. 24). Os próprios resultados das reações de Minning com soro de seus cães foram irregulares, mostrando oscilações "rítmicas" atribuidas às variações do poder impediente dos soros.

É de toda importância salientar que nem todos os antígenos preparados com baço de cão infectado são empregaveis na reação, dependendo o seu uso de ensaios preliminares para controle de sua especificidade. Segundo Villela & Bicalho (1923), "às vezes o antígeno no momento da reação se mostra de pouco valor". Lacorte (1926) refere que um de seus antígenos, recentemente preparado e experimentado com cerca de 20 soros, deu resultados inteiramente

inespecíficos, sem que fosse isto devido ao seu poder impediente, previamente dosado. Antes de aplicar a reação a doentes dos arredores de Belo Horizonte, Villela (1930) submeteu o antígeno a uma série de provas cujo resultado lhe permitiu confiar nos resultados mais tarde conseguidos. Como bem diz Muniz (1930, pág. 897): "sucede que ese antígeno no siempre funciona con regularidad y fijeza, segun la opinión de Lacorte, quien aconseja el maximo cuidado en su uso, y solamente considerarlo utilizable después de submeterlo a dosajes rigurosos y ensaios con testigos, tanto de pacientes de otras enfermedades como de individuos normales, a fin de evitar fijación sin especificidad alguna".

Por fim, não obstante asseverar Minning (p. 318) que extratos de orgãos de cão normal nenhum poder fixador tenham mostrado, em outro lugar (pág. 326) consigna resultados positivos obtidos com tais extratos, em presença de soros de anemia perniciosa e outros que deram reação positiva tambem com extratos de orgãos de cão infectado.

Com o seu trabalho, Minning não demonstrou que a reação de Guerreiro-Machado é inteiramente inespecífica, mas apenas que os antígenos que empregou nenhuma especificidade possuiam. Estamos em pleno acordo com Yorke (1937, pág. 295), quando conclue sobre o valor desta reação: "Whilst the evidence is probably as yet insufficient to warrant a definite opinion regarding the significance of the Machado reaction, sufficient work seems to have been done to indicate that it cannot be brushed aside as unworthy of serious investigation".

Procurando obter um melhor antígeno para a reação, Kelser (1936), preparou emulsões hidro-glicerinadas de culturas recentes de *S. cruzi* em meio de Bonacci, com as quais conseguiu resultados bastante bons. Entretanto, teem ainda estes antígenos a desvantagem de serem instaveis, pois se tornam rapidamente impedientes (tempo máximo de utilização, 1 mês).

Em vista dos inconvenientes oferecidos pelos antígenos anteriormente usados na reação de fixação do complemento na doença de Chagas, decidimos ensaiar o uso de antígenos alcoólicos de cultura de *S. cruzi*, encorajados pelos resultados favoraveis obtidos por Cunha & Dias (1938-1939) nas leishmanioses, com antígenos alcoólicos de cultura de *Leishmania*. Estes autores (ined.) tentaram preparar segundo a mesma técnica antígenos alcoólicos de *S. cruzi*, porem não obtiveram culturas em placa suficientemente ricas. Usamos porisso culturas em meio liquido, se bem que do ponto de vista da pureza do material básico do antígeno elas sejam inferiores às culturas em placa, sobre meio sólido.

CULTURA DO *S. CRUZI* PARA PREPARO DO ANTÍGENO

Empregamos a princípio o meio de Bonacci, seguindo o processo usado por Kelser (1936) no preparo de seu antígeno. Neste meio conseguem-se culturas muito abundantes, mas ao serem colhidos os flagelados retira-se quase sempre uma certa quantidade de agar-sangue que é depois dificil de se separar por centrifugação. Este inconveniente, que tambem é apresentado por outros meios sólidos, torna-se mais acentuado quando se empregam maiores recipientes para obtenção das culturas. Usamos tambem um meio liquido composto de caldo glicosado e sangue de coelho hemolisado por água distilada; o *S. cruzi* nele vegeta bem, porem as culturas são mais pobres e duram menos do que as em meios sólidos ou semi-sólidos.

Partindo de meios conhecidos como favoraveis ao desenvolvimento do *S. cruzi*, adotamos uniformemente o seguinte método, que proporciona culturas suficientemente ricas, com a vantagem de poderem ser empregadas no preparo do antígeno quase livres de partículas do meio.

As culturas são feitas em frascos de Roux, a cujo gargalo é adaptado um tubo de 1 centímetro de diâmetro aproximadamente, para diminuir os riscos de contaminação durante a manipulação. No interior do frasco colocam-se 100 cm^3 de gelose (agar 20 gr., peptona 10 gr., extrato de carne, 5 gr, cloreto de sódio 6 gr, água 1000 cm^3); após esterilibação, deixa-se resfriar a 50-55°, junta-se 10% de sangue desfibrinado de coelho ou de carneiro, agita-se e deixa-se solidificar o meio sobre uma das faces da garrafa. Cobre-se então sua superfície com 100 cm^3 de caldo nutritivo da seguinte composição : água 1000 cm^3, extrato de carne (Swiff) 3 gr. peptona 20 gr, glicose 30 gr, cloreto de sódio 6 gr, (pH 7,0-7,2). O caldo é esterilizado e conservado em aparelhos de distribuição com a capacidade de 3 ou 5 litros, o que facilita a sua repartição nos frascos de Roux. Estes devem ser semeados com boa quantidade de semente (10 cm^3) e conservados a 20-25° C; ao cabo de 15 a 20 dias, as culturas estão em condições de ser utilizadas.

PREPARO DO ANTÍGENO

Recolhe-se a porção liquida das culturas, centrifuga-se e lava-se três vezes o depósito com soro fisiológico. Esgota-se o soro quanto possivel, junta-se acetona pura num volume 10 vezes maior que o do depósito e agita-se repetidamente durante 24 horas. Após centrifugação, pipeta-se a acetona e deixa-se o depósito secar na estufa a 37° (pode conservar-se o material dissecado, para só ser usado no preparo final quando se tenha o bastante para a obtenção de quantidade apreciavel do reativo). A massa obtida

é então pesada, triturada finamente e acrescentada de álcool absoluto na proporção de 1 cm³ para cada centigramo de pó. Após permanência na estufa a 37° durante 20 dias, em vidro bem fechado, que deve ser agitado frequentemente, está terminado o preparo do antígeno alcoólico bruto.

Os antígenos que usamos eram mistos, constituidos por amostras de *Schizotrypanum* isoladas de homem, gambá e morcego (*Hemiderma perspicillatum*).

EMPREGO — O antígeno foi geralmente empregado, no seu estudo preliminar e nas reações, em diluições feitas na hora, retirando-se com pipeta o álcool sobrenadante e diluindo-se gota a gota em soro fisiológico, sob constante agitação. O líquido toma um aspecto ligeiramente opalescente. Estudadas pelos métodos usuais as suas propriedades (poder impediente, hemolítico e fixador), foi usado nas reações em dose nunca superior à metade da dose mínima impediente, em diluições a 1/10 ou inferiores. O quadro 1 mostra uma das séries de ensaio do poder fixador do antígeno (n. 7, preparado em 7-7-41 e ensaiado em 14-11-41) em presença de diversos soros e de 2 unidades de complemento.

QUADRO 1

TUBOS	1	2	3	4	5
Soro inativado	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Antígeno a 1/6	0,05	0,1	0,15	0,2	—
Compl. cobaia 1/10 (2 unidades)	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
Soro fisiólogico	1,15	1,1	1,05	1,0	1,2
(após 1 hora a 37°, 2 cm3 de sistema hemolítico dosado)					
Soro, 103 mol. chagas	++——	++++	++++	++++	————
Soro 105, mol. Chagas	++——	++++	++++	++++	————
Soro 150, leishmaniose tegumentar	————	+———	++——	++++	————
Soro 133, normal	————	————	————	————	————

A reação principal foi feita segundo o esquema do Quadro 2.

QUADRO 2

TUBOS	1	2	3
Soro	0,2	0,2	0,2
Antígeno	0,2	0,2	—
Compl. cobaia 1/10	1 u.	2 u.	1 u.

Soro fisiol. q s. para 2 cm3. Banho-maria 1 hora; sistema hemolitíco 2 cm3; banho-maria 1 hora, leitura. Leitura definitiva 12-18 horas após permanência na geladeira.

Os resultados até agora obtidos, das reações praticadas com 83 soros humanos, estão relacionados no Quadro 3. Algumas dessas reações foram

feitas pelos Drs. A. Martins, V. Versiani e J. N. Peres, de B. Horizonte, utilizando o mesmo antígeno por nos fornecido (usando 0,1 e 0,2 cm^3 de soro e duas unidades de complemento), tendo sido os resultados concordantes com os nossos.

QUADRO 3

RESULTADOS DAS REAÇÕES FEITAS COM 83 SOROS HUMANOS

DIAGNÓSTICO CLÍNICO	OBSERVAÇÕES	N. DE SOROS	R. DE FIXAÇÃO DO COMPLEMENTO	
			Antig. alc. S. cruzi	Wassermann
Doença de Chagas	*S. cruzi* ao ex. direto	6	+	—
	Xenod. posit.	19	+	—
	" "	1	+	+
	" "	1	—	—
Doença de Chagas ?	Miocardite cronica	6	+	—
		3	—	—
	Mal engasgo	1	+	—
	Bocio	2	—	—
Sífilis		5	—	+
Leishmaniose tegumentar	*L. brasiliensis*	7	+	—
		2	+	+
		1	—	+
		1	—	—
Malária	*P. vivax*	5	—	—
		2	—	(0)
Bouba	*T. pertenue*	2	—	+
		1	+	+
		1	—	—
Ancilostomose	*N. americanus*	1	—	—
Tuberculose		1	—	—
Psoriasis		1	—	—
Soros normais		14	—	—

Resultados das reações feitas com 83 soros humanos.

O Quadro 3 mostra que, de 27 casos autênticos de doença de Chagas, a reação foi positiva em 26 (96,3%), coincidindo uma única vez com a R. W. positiva. Um caso com xenodiagnóstico positivo deu reação negativa; o xenodiagnóstico foi repetido depois no paciente, duas vezes, resultando negativo. De 12 casos possiveis de doença de Chagas, residentes em zona de barbeiro, a reação foi positiva em 7, dos quais 2 morreram subitamente, (1) fato que ocorre com frequência na forma cardíaca da tripanossomose. Em 5 soros sifilíticos com R. W. fortemente positiva a reação foi negativa. As

(1) — Casos de Goiaz. Vide Romeiro, 1941.

duas reações foram feitas concomitantemente em 81 soros: apenas em 4 (2 de leishmaniose, 1 de bouba e 1 de doença de Chagas) ambas foram positivas; em 30 ambas foram negativas; em 39 a R. W. foi negativa e a reação foi positiva; em 8 a R. W. foi positiva e a reação foi negativa. Onze soros de leishmaniose tegumentar foram experimentados, sendo a reação positiva em 9, dos quais 2 com R. W. positiva. Em um caso de bouba de Teófilo Otoni (Minas Gerais), cidade onde teem sido encontrados casos de tripanossomose procedentes de zonas de *barbeiro* (Ferreira Lopes, 1941) a reação foi fracamente positiva (R. W. fortemente positiva), tendo sido negativa em 3 outros casos de dita moléstia. A reação foi negativa em 14 soros normais, 7 de malária, 1 de tuberculose, 1 de ancilostomose e 1 de psoriase, de indivíduos vivendo longe das zonas de tripanosomose endêmica.

Os resultados positivos conseguidos na quase totalidade dos casos certos de esquisotripanose, e os resultados negativos obtidos com soros normais, de sifilíticos e de outras doenças, demonstram uma especificidade apreciavel do antígeno e tendem a mostrar o valor da reação como método auxiliar para o diagnóstico da doença de Chagas. O antígeno não é, porem, dotado de estrita especificidade, porquanto resultados positivos foram verificados em casos de leishmaniose tegumentar (81,8%), o que torna a reação uma reação de grupo, explicavel pelas afinidades biológicas dos protozoários causadores da doença de Chagas e das leishmanioses. Num único caso de bouba com reação fracamente positiva, não poude ser verificada a possibilidade de tratar-se de um indivíduo portador tambem do *S. cruzi*.

O número de soros que nos foi dado experimentar ainda é sem dúvida pequeno para permitir conclusões definitivas sobre o valor real da reação. porem os resultados já obtidos são favoraveis, e justificam a recomendação do emprego do antígeno alcoólico de cultura do *S. cruzi* na reação de fixação do complemento na doença de Chagas.

AGRADECIMENTOS

Expressamos o nosso agradecimento aos Drs. A. Martins, V. Versiani, A. Tupinambá e J. N. Peres, de Belo Horizonte, pela sua valiosa cooperação para este trabalho, especialmente no que respeita ao controle dos nossos resultados; e aos Drs. Cid Ferreira Lopes, de Teófilo Otoni, D. S. Romeiro, de Pires do Rio, Goiaz e C. Drolle da Costa, da Santa Casa do Rio de Janeiro, pela boa vontade com que nos proporcionaram soros de doentes das respectivas clínicas.

SUMÁRIO

Os autores passam em revista os diferentes antígenos até agora empregados na reação de fixação do complemento na moléstia de Chagas. Pro-

põem o uso de um antígeno alcoólico feito com culturas de *S. cruzi*, assim preparado: lavam três vezes os flagelados das culturas com soro fisiológico; juntam acetona pura (10 vezes o volume do depósito) e deixam 24 horas agitando frequentemente; centrifugam, desprezam o líquido e secam o depósito a 37°; pesam, trituram e juntam álcool absoluto na quantidade 1 cm^3 por cada centigramo; conservam a 37° durante 20 dias, agitando diariamente; para uso, diluem o álcool límpido na água fisiológica aos poucos e sob constante agitação.

A reação foi praticada com 83 soros humanos, sendo positiva em 96,3% dos casos de doença de Chagas e em 81,8% dos casos de leishmaniose tegumentar, doença cujo agente etiológico tem estreitas afinidades com S. *cruzi*.

Em 81 soros a reação foi feita paralelamente com a R. W., obtendo-se apenas 4 vezes a positividade de ambos os testes.

Os primeiros resultados das reações feitas com este antígeno podem ser considerados bastante favoraveis, sendo entretanto necessária uma maior experiência para se ajuizar do valor real da reação no diagnóstico da moléstia de Chagas.

APÊNDICE

Antes da impressão do presente trabalho foram feitas mais 20 reações com cada um dos antígenos, com os seguintes resultados:

Diagnóstico clínico	*N.° de soros*	*R. antígeno cruzi*	*R.W.*
Doença de Chagas (xenodiagnóstico positivo)	1	+	—
Doença de Chagas (doentes de Lassance com arritmias)	6	+	—
Idem	1	duvidoso	—
Epilepsia	4	—	—
Epilepsia (caso de Lassance)	1	+	+
Bócio	1	—	—
Méga-esôfago	1	—	—
Tabes	1	duvidoso	+
Encéfalopatia infantil	1	duvidoso	—
Soros normais	3	—	—

Agradecemos ao Dr. Antonio Couceiro a remessa dos soros com que trabalhamos.

BIBLIOGRAFIA

Cunha, A. M. & Dias, E. — 1938

C. R. Soc. Biol., *129*:991

Cunha, A. M. & Dias, E. — 1939

Brasil Méd., 53:89

Cunha, A. M. & Villela, E. — 1919

Citados por Villela & Bicalho, 1923

Ferreira Lopes, C. — 1941

Minas Médica 8 (47): 244 — 258.

Guerreiro, C. & Machado, A. — 1913

Brasil Méd., n. 23:225.

Kelser, R. A. — 1936

Am. Jl. Trop. Med., 16:405

Lacorte, J. G. — 1927

Memórias Inst. Oswaldo Cruz, 20:197

Minning, W. — 1935

Arch. f. Schiffs-u. Tropenhyg. 39:315

Muniz, J. — 1930

5ª *Reunión Soc. Arg. Pat. Reg. N.*, 2:897

Patto, O. — 1930

An. Fac. Med. Minas Gerais

Romeiro, O. S. — 1941

O Hospital 20 (4): 587 — 590

Villela, E. — 1930

An. Fac. Med. Minas Gerais, 2 (1): 1 — 18

Villela, E. & Bicalho, C. — 1923

Memórias Inst. Oswaldo Cruz, 26:13-29

Os bacilos de Hansen e de Stefansky *

Contribuição para a sua morfologia

pelo

Dr. H. C. de Souza-Araujo

(Com 2 estampas coloridas e 5 em negro)

Com os progressos da leprologia teem sido descobertas novas analogias etiopatogênicas e anatomopatológicas entre a lepra humana e a lepra murina, robustecendo-se assim a convicção de alguns leprólogos, sobretudo os mais afeitos às pesquisas de laboratório, de que se trata de uma mesma doença.

Como contribuição para o estudo comparativo dos agentes etiológicos dessas duas lepras, não podendo incluir a terceira — a *lepra bubalorum* — por falta de material entre nós, resolvi publicar uma serie de desenhos e fotografias das várias formas e aspectos em que se apresentam os bacilos de HANSEN e de STEFANSKY, material esse que venho acumulando há vários anos.

Este meu estudo baseia-se em material de lepra humana procedente de vários Estados do Brasil e material de lepra murina procedente de três paises da Europa. Os desenhos foram feitos por dois técnicos do Instituto Oswaldo Cruz, os Srs. Raymundo Honorio e Antonio Pugas, no período de 1933 a 1941, sempre em condições tais que não era possivel um *parti-pris* nem a sugestão ou interesse de fazer um parecido com outro. Assim, na estampa 1, as figuras de 1 a 8 teem elementos tão semelhantes entre si, embora multiformes, que seria dificil, pelo simples exame visual, não se aceitar como pertencentes a um mesmo germe. Entretanto essas figuras representam os bacilos de HANSEN e de STEFANSKY em condições diversas, como veremos a seguir.

A figura 1, desenho de um esfregaço feito por expressão dum leproma flórido dum jovem de 20 anos, que nunca tinha sido tratado da sua lepra, nos mostra um emaranhado de bacilos de HANSEN homogêneos, curtos e lon-

* Recebido para publicação a 25 de fevereiro e dado à publicidade em abril de 1942.

gos, alguns filamentosos, outros de extremidades afiladas, ou em halteres, clava, cocotrices e granulações isoladas, só faltando os agrupamentos sob a forma de "maço de cigarros" para completar a descrição classica que ARMAUER HANSEN deu, em 1882, ao bacilo que descobriu em 1868. Tratando-se de um caso incipiente de lepra, virgem de qualquer tratamento que pudesse atacar os bacilos, não podemos dizer que os elementos granulosos desse elegante quadro pleomórfico sejam fases degenerativas do bacilo, agente do mal.

Na figura 2, desenho dum esfregaço de baço de camondongo inoculado a 20-8-1936 com bacilo de STEFANSKY, amostra de MARCHOUX, e morto a 29-12 do mesmo ano, com infecção moderada, a maioria dos elementos ácido-álcool resistentes são idênticos aos da figura 1 — bacilos, cocotrices e grânulos. Há a mais apenas dois elementos filamentosos, ligados pelas suas extremidades, cada um com uma granulação metacromática, tipo BABÈS - ERNST, no centro.

Na figura 3 temos de novo o bacilo de HANSEN procedente da serosidade dum cisto localizado no dorso do indicador esquerdo, circundado por uma zona de anestesia, únicos sintomas de lepra numa senhora branca, de 40 anos, costureira, de Juiz de Fora. A curetagem da parede interna do cisto, que foi aberto com o galvanocautério, deu material rico tambem em feixes, confirmando tratar-se daquele bacilo. Nessa figura temos, alem de elementos já vistos nas figuras 1 e 2, estreptobacilos e longos cocotrices, provavelmente ligados dois a dois pelas suas extremidades.

A figura 4 representa o bacilo de STEFANSKY em esfregaço de sangue obtido a 6-1-37 por biopsia da orelha dum grande rato cinzento inoculado a 20-8-36 com material da amostra MARCHOUX. Alem de um feixe compacto de bacilos, parecendo uma globia em formação, os demais elementos são iguais aos vistos nas figuras anteriores.

O material correspondente às figuras 5, 6 e 7 é duma procedencia digna de especial comentário: L.L., homem branco, de 50 anos, sofrendo de lepra mista antiga, é plantador de algodão num Estado nordestino e conta que, inúmeras vezes, quando dormia entre os fardos daquele produto, foi mordido nos pés, pelos ratos, aos quais atribue a sua infecção. MARCHOUX descreveu, em 1923, um caso de lepra murina no homem.

A figura 5 representa um esfregaço de sangue da orelha de L.L., colhido a 30-12-36 no início duma febre leprótica com exantema generalizado. Na figura 6, esfregaço do seu sangue digital colhido 5 dias após, vê-se em *a*) um elemento semelhante a um leucócito basófilo ou mielócito que houvesse perdido o seu nucleo. Trata-se duma globia granular. Em *b*) vê-se como que uma mecha de filamentos formados por finissimos grânulos dispostos em

cocotrices de vários comprimentos, intermeados de alguns poucos bacilos homogêneos e outros granulosos.

A figura 7 representa um esfregaço de gânglio mesentérico de rato branco infectado com sangue venoso de L.L. colhido e injectado *in natura*, por via intraperitoneal, a 30-12-36. O rato morreu 43 dias após, com os gânglios hipertrofiados e carregados de bacilos. Nessa figura ao lado duma célula corada em azul vê-se uma massa de pequenos feixes de cocotrices e agrupamentos de finos grânulos. A morfologia destes elementos não difere da dos representados na figura 1, esfregaço de suco de leproma flórido.

A figura 8 em *a*) representa um esfregaço de gânglio mesentérico — massa de bacilos a.a.r. homogeneos — e em *b*) um esfregaço de gânglio axilar — bacilos longos, filamentosos e cocotrices — dum jovem camondongo infectado por convivência com os pais que foram inoculados com o bacilo de STEFANSKY, a 20-8-36. Esse jovem murídeo foi sacrificado a 6-3-37 por apresentar placas de alopécia e outros sinais de infecção leprótica. Este fato teve confirmação posterior.

A figura 9 representa um esfregaço de muco nasal dum leproso de 30 anos, de S. Paulo, que depois de ter sido um caso L2, estava com a pele negativa há mais de 2 anos e apesar dessa massa de bacilos, verificada no seu muco a 18-1-37, até fins de 1941 não teve recaida.

Essa massa de bacilos se assemelha à massa representada em *a*) da figura 8 e à figura 10, que foi desenhada dum esfregaço dum nódulo ulceroso da cauda dum rato cinzento inoculado com bacilo de STEFANSKY (20-8-36), por via intratesticular. As lesões da cauda desse murídeo lembravam as que se obteem na esporotricose experimental.

A figura 11 parece uma emulsão de cultura de bacilo a.a.r., entretanto é a cópia dum esfregaço de sangue obtido da polpa digital de L.L., a 6-1-37, último dia de febre alta.

A figura 12 é uma globia granular, semelhante à figura 6 em *a*), vendo-se entre essa massa de grânulos alguns poucos bacilos homogêneos. Ao lado dessa globia veem-se, corados em azul, dois núcleos de leucócitos. Trata-se dum esfregaço de pústula produzida pela diatermocoagulação na planta do pé dum leproso considerado como negativado.

As figuras 13 e 14 representam o bacilo de STEFANSKY em esfregaços de fezes de ratos inoculados a 1-9-36 com material de Londres (amostra LAIDLAW), e examinados a 25-6-37 quando apresentavam sintomas gerais de infecção. Na 13 veem-se inúmeros feixes e elementos isolados de bacilos homogêneos e fortemente corados pela fucsina de ZIEHL. Entre os bacilos

veem-se elementos cianófilos provavelmente detritos alimentares. Em 14 vê-se uma grande globia, semelhante à *"boule épineuse"* de JEANSELME. Os bacilos dispostos irregularmente na sua periferia parecem ter sido arrancados da globia pela manobra do *frottis*.

As figuras 15, 16 e 17 parecem todas a mesma coisa: uma emulsão de cultura. Entretanto a primeira representa um esfregaço de sangue cardíaco dum rato, 7 meses após ter sido inoculado com material de lepra murina. A 16 representa uma massa globóide de bacilos encontrada num esfregaço de baço de rato infectado com suco ganglionar do leproso G. V., a 12-1-40, e a 17 reproduz o aspecto dum esfregaço de emulsão de fígado de outro rato infectado com esse mesmo material de lepra humana, conforme minha publicação nas Memórias de Setembro de 1941.

Na figura 1 da estampa 2 representamos uma gigantesca massa de bacilos cocciformes, ácido-alcool resistentes, parecida com a figura de MARCHOUX (1923) designada como *Mycobacterium pulviforme*. Essa grande massa microbiana era a única num vasto esfregaço de pus dum pequeno abcesso, semelhante a um elemento de acne vulgar, da região deltoideana esquerda duma moça de 17 anos, filha de leproso tuberculóide, e que fora um caso L3. Tal abcesso surgiu após uma moderada reação febril, com embolismos discretos, estando ela com a pele limpa de lesões lepromatosas há cerca de dois anos.

A figura 2 da mesma estampa representa uma massa de poeira a.a.r. bem delimitada por uma borda cianófila. No centro há dois grandes vacuolos semelhantes às células de LOBEL. Nas bordas os elementos a.a.r. são em menor número. Trata-se dum esfregaço de material obtido por incisão galvanocáustica do abcesso dum ramo do nervo cubital, dum leproso L2-N2, procedente de Goiaz. E a figura 3 representa metade duma gigantesca massa de poeira a.a.r., mais densa e melhor corada do que a anterior, encontrada em suco dum gânglio inguinal do doente G. V., que tendo sido L2 limpou-se da pele com o tratamento e permaneceram hipertrofiados e baciliferos os gânglios inguino-crurais. Após algumas injeções intraganglionares de Calmestrol Bayer a hipertrofia se reduziu assim como os bacilos, que, nalguns gânglios chegaram a desaparecer.

Passemos agora a comparar as microfotografias, todas feitas no *atelier* de Manguinhos pelo Sr. J. Pinto. As figuras 1, 2 e 3 da estampa 3 representam vários tipos de globias produzidas pelo bacilo de STEFANSKY.

MARCHOUX e SOREL afirmaram, em 1913, que: *"Les bacilles de* STEFANSKY*... ne se disposent jamais en globies"*.

Era esse o carater diferencial entre os agentes das lepras humana e murina. Mais tarde o próprio MARCHOUX emitiu a hipótese de que devia

haver pelo menos seis variedades de bacilos da lepra murina e que uma delas se adaptou ao homem.

No Congresso Internacional de Lepra, realizado no Cairo em 1938, apresentei um trabalho, fartamente documentado, provando que tambem o bacilo de STEFANSKY produzia globias, concluindo com estas palavras :

"Such findings make STEFANSKY'S *bacillus approach more nearly in identity to* HANSEN'S *bacillus"*.

Antes de ler esse trabalho em assembléia geral do Congresso submetí-o à apreciação do Prof. MARCHOUX, que se declarou favoravel às minhas conclusões. Aliás em 1933 DENNEY e EDDY já haviam afirmado que:

"...we are of the opinion that globus formation is a characteristic of rat and human leprosy".

Em 1934, na sua monumental tese doutoral de Utrecht, intitulada *"Lepra bubalorum"*, L. W. M. LOBEL provou à saciedade que essa 3.ª lepra, a do bufalo, tambem produz a clássica *globia* bacilar, por DENNEY, EDDY e SOUZA-ARAUJO chamada de colônia.

A figura 3 da estampa 3 representa um esfregaço de lepra humana mostrando uma globia íntegra, uma verdadeira bola esférica, e outra esfacelada pela esfregação na lâmina. Às globias do bacilo de STEFANSKY cabe melhor a denominação de *"boules épineuses"* dada por JEANSELME às globias do bacilo da lepra humana.

Na estampa 4 reuní 10 figuras representando diversos aspectos do bacilo de STEFANSKY, desde a grande massa da figura 1, tão parecida com os corpos pardos do trabalho sobre lepra ocular publicado em 1873 por BULL e HANSEN. Veem-se aí 4 documentos comprobatórios de que a lepra murina tambem produz bacilemia: são esfregaços de sangue obtido por punção cardíaca de ratos infectados experimentalmente, com as amostras inglesa, francesa e alemã do bacilo de STEFANSKY. As demais figuras dessa estampa mostram emaranhados de bacilos granulosos em esfregaços de vísceras e uma globia (figura 6) em fezes de ratos do Lote 1, 1940, inoculados com material de LAIDLAW, do bacilo da lepra murina.

Na estampa 5 figuram 6 microfotos, cuja explicação que a acompanha é bastante, enquanto que os da estampa 6 exigem certos comentários. Um leproso de 30 anos, natural de S. Paulo, caso L2, apresentava no dorso da mão direita um nódulo subcutâneo movel, do tamanho duma azeitona, simulando um lipoma. Extirpado esse nódulo pelo Prof. PEDRO MOURA, o seu exame histopatológico revelou ser um leproma. A emulsão deste, feita imediatamente após a operação, revelou massas de bacilos homogêneos. Inocu-

lada em 4 ratos brancos (Lote 16) um deles 6 ½ meses após apresentou típica infecção ganglionar, cujos esfregaços são idênticos ao do material inoculado. As figuras 2 e 3 apresentam os bacilos em franca degeneração na serosidade que se coletou repetidamente no ponto donde foi extraído o leproma, formando verdadeiros cistos, que esvaziados à seringa reincidiram várias vezes.

As figuras da estampa 7 são cópias de esfregaços duma espécie de material raro em exames de rotina. Trata-se de massa caseosa de neuromas do antebraço esquerdo dum leproso goiano, caso L2-N2, extirpada por incisão galvanocáustica.

Veem-se aí duas grandes massas bacilares com o aspecto de células multinucleares e vacuoladas, muito bem delimitadas, que não se romperam após demorada manobra de esfregação nas lâminas.

CONCLUSÕES

O autor mostra a grande semelhança morfológica entre os agentes etiológicos da lepra humana e da lepra murina, confirmando o conceito de MARCHOUX de que eles são bacilos irmãos.

Os estudos experimentais do autor mostraram tambem que a patogenia dessas duas infecções é idêntica, restando mais acurados estudos para explicar a sua dissemelhança anatomopatológica.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

The author's contribution to the morphology of HANSEN and STEFANSKY bacilli is based upon various kinds of material from human and rat leprosies. The first eight figures of his first plate are, notwithstanding their pleomorphic aspects, acceptable as belonging to the same microorganism, but they belong to both agents of said leprosies.

The paper is illustrated with seven plates, two being in full colors, representing the most characteristic aspects of both *Mycobacteria*, proceeding from natural and experimental infections.

The author arrived to the following conclusions :

1 — The morphological similitude of HANSEN and STEFANSKY bacilli confirms the assertion of MARCHOUX that they are brothers.

2 — Experimental researches carried out by the author showed that the pathogeny of both diseases are identical, and that it is needed more acurate studies to explain their anatomopathological dissimilitudes.

BIBLIOGRAFIA

DENNEY, O. E. & EDDY, BERNICE E.

1933.- Comments on in vitro behavior of lepra and certain other acid-fast microorganisms in presence of leukocytes. Archives of Dermatology and Syphilology, *27*:794-804.

HANSEN, ARMAUER

1868. Bidrag til Spedalskedens Karakteristik
Nord Med. Arch. Kristiania, T.I, N.° 3, 1868.

HANSEN, ARMAUER

1882. Études sur la bactérie de la lepre.
Archives de Biologie, Gand, 1882, T.3, N.° *4*:659-667.

LOBEL, L. W. M.

1934. Lepra Bubalorum. Tése. Utrecht, 1934.

LUTZ, ADOLPHO.

1886. Zur Morphologie des Mikroorganismus der Lepra.
Dermatologische Studien. Ed. P. G. Unna, 1886, N.° 1. Hamburg.

MARCHOUX, E. & SOREL, F.

1913. La lèpre des rats. LEPRA, *13*:171-206.

MARCHOUX, E.

1919. La Lèpre. *In* Traité de pathologie Exotique.
Vol. 7, Maladies de la Peau, p. 336.

MARCHOUX, E.

1924. La lèpre du rat et sa transmission probable à l'homme. Rapport IIIe. Conférence de la Lèpre, 1924:109.

SOUZA-ARAUJO, H. C. de

1938. The morphology of Stefansky's bacillus (*Mycobaterium leprae murium*) according to experimental researches carried out with material from England, France and Germany. Intern. Jour. Leprosy, *6*(3):468.

SOUZA-ARAUJO, H. C. de

1938. A lepra dos Ratos.
Memorias do Inst. Oswaldo Cruz, T. 33 (2):297-318.

SOUZA-ARAUJO, H. C. de

1941. Infecção de ratos brancos com suco ganglionar de leproso, seguida do isolamento dum bacilo ácido-álcool resistente de orgãos do murideo, em meio de Loewenstein.
Memorias Inst. Oswaldo Cruz, T. 36 (3):379-385. 4 estampas.

STEFANSKY, W. K.

1903. Eine lepraaehnliche Erkrankung der Haut und der Lymphdruesen bei Wanderratten (Mus decumanus).
Centralbl. f. Bakteriologie, etc. Orig. 33 (7):481-487.

700.272 — F. 2

ESTAMPA 1

Fig. 1 — Esfregaço por expressão, dum leproma flórido do doente H.A., homem branco, de 20 anos, natural do Estado do Rio (18-1-1937).

Fig. 2 — Esfregaço do baço dum camondongo inoculado a 20-8-1936 com bacilo Stefansky, amostra Marchoux, recebida de Paris por avião nesse mesmo dia, e morto a 29-12-1936.

Fig. 3 — Esfregaço de serosidade dum cisto do indicador esquerdo de A.C., mulher branca, de 40 anos, natural de Minas Gerais, a 4-1-37. Não havia outro sinal de lepra e o cisto foi aberto com ponta de galvanocautério.

Fig. 4 — Esfregaço de sangue da orelha dum grande rato cinzento inoculado a 20-8-1936, por via testicular, com bacilo Stefansky, amostra Marchoux. Material colhido por biopsia a 6-1-1937. Além desses cocotrices havia feixes de bacilos.

Fig. 5 — Esfregaço de sangue colhido no lóbulo da orelha de L.L., homem branco, de 50 anos, do Nordeste, a 30-12-1936, durante uma reação leprótica febril.

Fig. 6 — Esfregaço de sangue colhido no dedo mediano do mesmo doente L.L., a 3-1-1937, durante o período febril.
Em *a*) vê-se uma globia granular. Em *b*) outro esfregaço de sangue colhido na orelha, no mesmo dia: vê-se uma mecha de bacilos.

Fig. 7 — Esfregaço de gânglio mesentérico de rato branco, inoculado por via peritoneal, com sangue venoso do doente L.L., no dia 30-12-36.
O rato morreu a 11-2-1937.

Fig. 8 — Material de camondongo branco filho de pais inoculados a 20-8-36 com bacilo de Stefansky, amostra Marchoux, e infectado por convivência com os pais. Apresentando placas de alopecia foi sacrificado a 6-3-1937. Em *a*) esfregaço de gânglio mesentérico; em *b*) esfregaço de gânglio axilar.

Fig. 9 — Esfregaço de muco nasal de J.L., homem branco, de 30 anos, natural de São Paulo, leproso negativado há 2 anos. Exame a 18-1-1937.

Fig. 10 — Esfregaço dum nódulo da cauda dum rato cinzento inoculado com bacilo de Stefansky (Lote 1A), por via testicular, a 20-8-1936.
Exame feito a 6-1-1937.

Fig. 11 — Esfregaço de sangue digital de L.L., no último dia de febre: 6-1-37.

Fig. 12 — Esfregaço de pústula obtida por electrocoagulação na planta do pé de A.E., homem branco, de 25 anos, do R. G. do Sul: 4-8-1939.

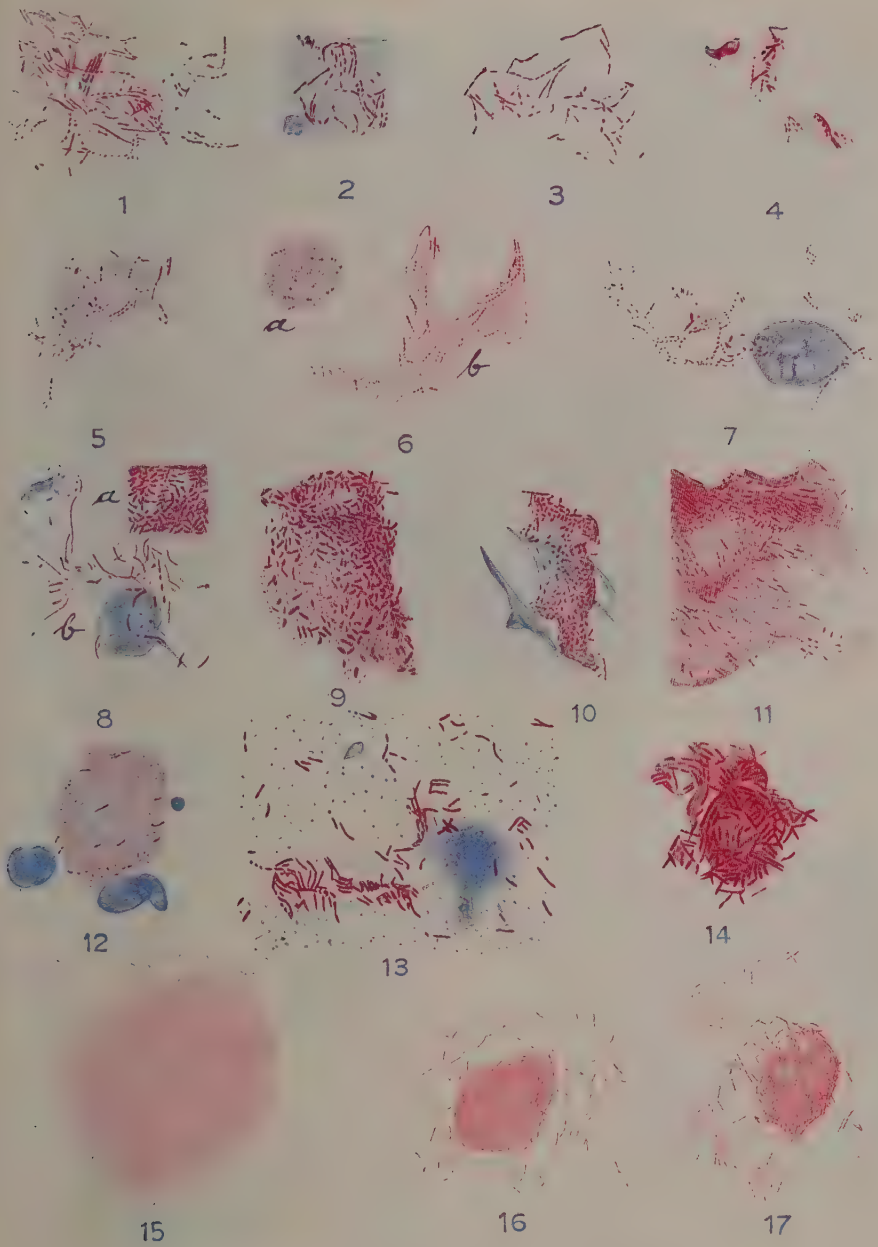
Fig. 13 — Esfregaço de fezes de rato inoculado a 1-9-36 com bacilo Stefansky, amostra de Londres, exame feito em 25-6-1937.

Fig. 14 — Esfregaço de fezes de outro rato inoculado com o mesmo material do n.º anterior e no mesmo dia. Exame feito a 25-6-37: Globia deformada.

Fig. 15 — Esfregaço de sedimento de sangue do coração de rato inoculado com bacilo Stefansky a 6-1-40 e sacrificado a 8-7-1940.

Fig. 16 — Esfregaço de baço de rato infectado com suco ganglionar de G.V., homem branco, de 26 anos. Inoculado a 12-1-1940.

Fig. 17 — Esfregaço de emulsão de fígado de outro rato inoculado com o suco ganglionar do doente acima, infecção produzida em 17½ meses.



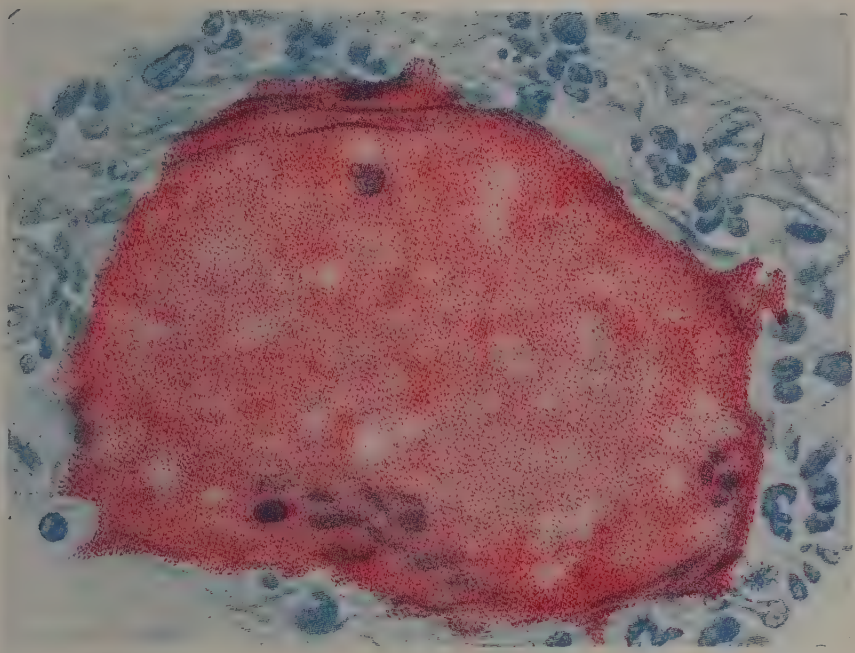
Souza Araujo: Os bacilos de Hansen e de Stefansky

ESTAMPA 2

Fig. 1 — Doente I.B., moça de 17 anos, natural do Distrito Federal. Esfregaço dum micro-abcesso semelhante a um elemento de acne vulgar surgido sobre uma embolia (embolismo bacilar de Muir) do braço esquerdo, após uma moderada reação leprótica ocorrida depois da sua pele ter sido limpa de todas as lesões lepromatosas. O pus dum desses elementos deu um esfregaço cujo único grupo microbiano está representado por essa massa compacta de microbacilos e poeira ácido-álcool resistentes. A figura 1 foi desenhada em junho de 1933 pelo desenhista do Instituto Oswaldo Cruz Raymundo Honorio.

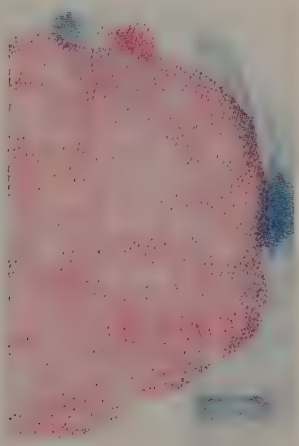
Fig. 2 — Esfregaço de material obtido por incisão galvânica de abcesso dum ramo superficial do cubital esquerdo do doente J.F., homem branco, de 30 anos, natural de Goiaz. Vê-se na figura 2 uma das grandes células frequentes no material estudado, formada de bacilos degenerados e poeira ácido-álcool resistentes. Desenho de Raymundo Honorio feito em junho de 1941.

Fig. 3 — Esfregaço de suco ganglionar do doente G.V., homem branco, de 26 anos, natural de S. Paulo, suco obtido após várias injeções intraganglionares de ester de Chaulmoogra. Massa de bacilos em franca degeneração. Desenho feito por Raymundo Honorio em abril de 1941.



1

2



3

Souza Araujo: Os bacilos de Hansen e de Stefansky

700.272 — F. 3

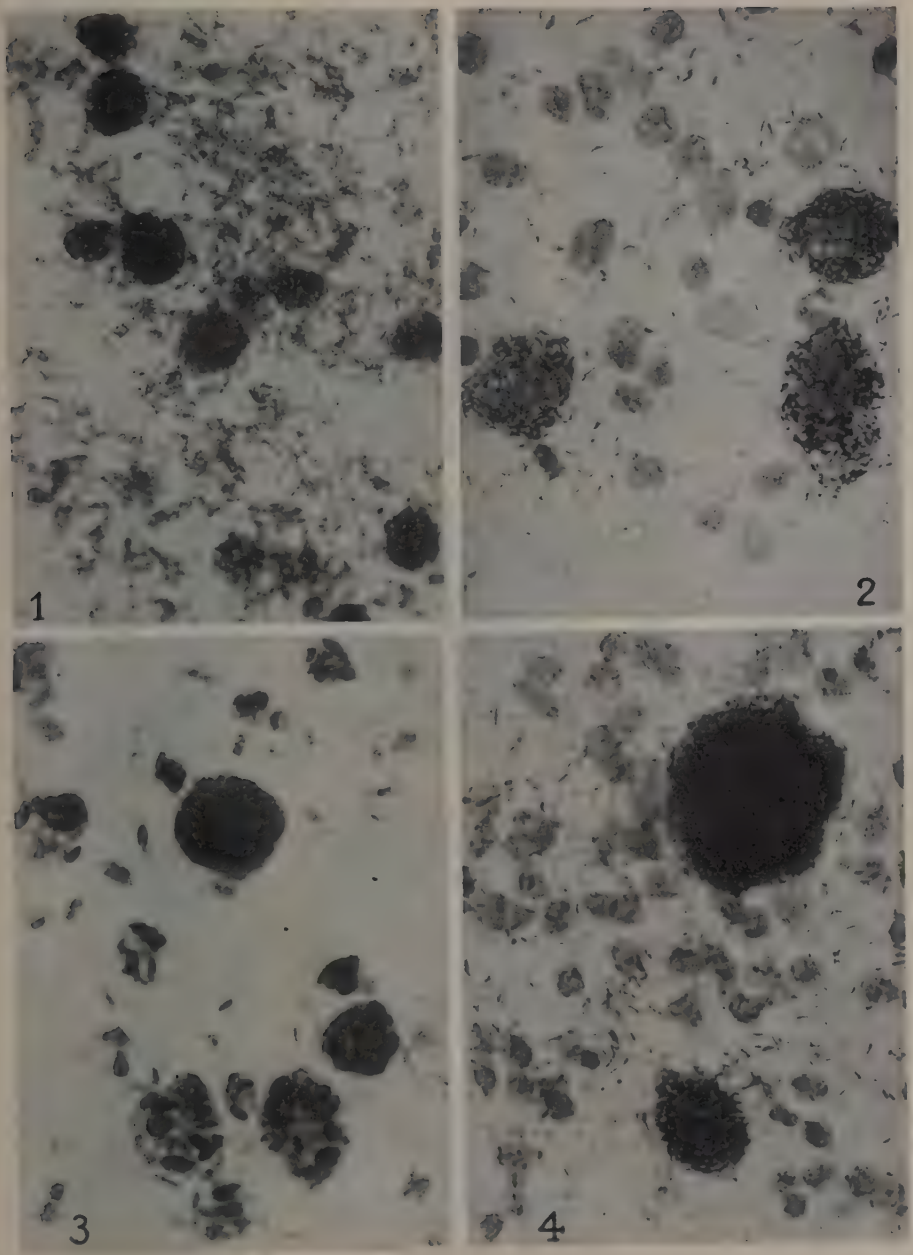
ESTAMPA 3

Fig. 1 — Bacilo de Stefansky: globias típicas produzidas pelo bacilo de Stefansky (amostra alemã) em rato branco inoculado pelo autor e morto a 28-1-1938. Esfregaço do leproma axilar.

Fig. 2 — Esfregaço do baço de rato (Lote 9, 1937) inoculado a 21-5-37 com material de lepra murina de Londres, por via subcutânea. Morreu a 6-7-938 com tumor axilar e abundantes globias nos esfreyaços de baço, fígado, rim, pulmões e testículos.

Fig. 3 — Esfregaço de pus de lesão fechada do menino José F., 7 anos, do Piauí. As duas globias de bacilo de Hansen são iguais às da figura 1 do bacilo de Stefansky. Foto 24-9-1941.

Fig. 4 — Outro esfregaço do baço de rato do Lote 9, 1937, morto a 6-7-38, com uma globia gigante de bacilo de Stefansky.



Fotos J. Pinto

Souza Araujo: Os bacilos de Hansen e de Stefansky

ESTAMPA 4

BACILO DE STEFANSKY. Lote 1, 1940

Fig. 1 — Massa de bacilos homogêneos em esfregaço de fígado de rato do Lote 1, inoculado a 6-1-1940 com material de lepra murina de Londres e morto a 28-6-1940.

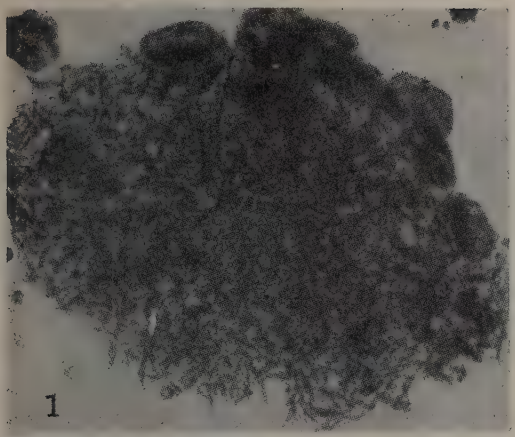
Fig. 2, 4, 9 e 10 — Esfregaços de sedimento de sangue obtido por punção do coração de ratos do Lote 1, 1940, sacrificados a 8-7-1940.
Nessas massas de bacilos prevalecem os do tipo cocotrice e granulosos mono ou bipolares.

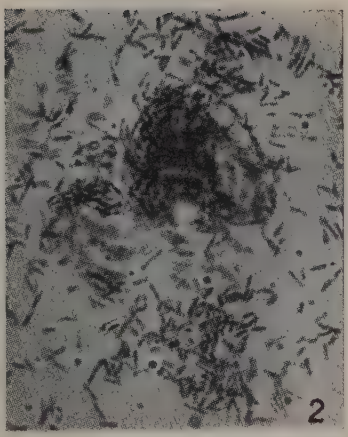
Fig. 3 — Esfregaço de rim dum rato do Lote 1, 940, morto a 27-7-40, mostrando um emaranhado de bacilos granulosos.

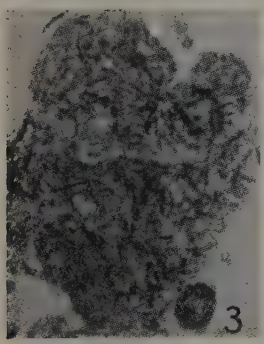
Fig. 5 — Esfregaço de baço de rato do Lote 1, 940, sacrificado a 28-6-40.

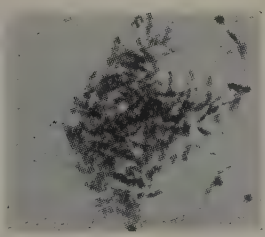
Fig. 6 — Esfregaço de fezes de rato do Lote 1, 940, morto a 22-2-40, após 45 dias da inoculação, mostrando globia.

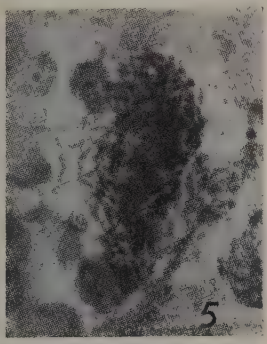
Fig. 7 e 8 — Esfregaços de rim e baço de rato do Lote 1, 940, morto a 27-7-40, mostrando bacilos nodulosos e cocotrices.

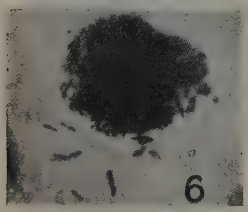


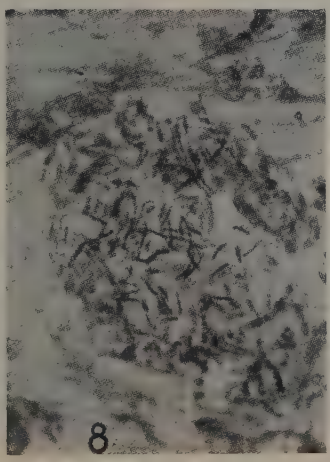


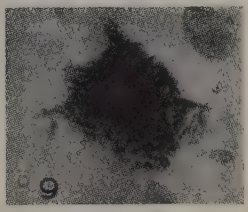


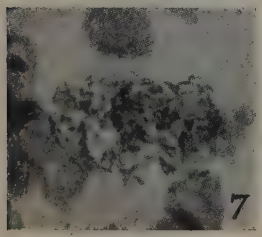


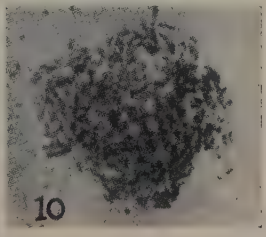












Fotos J. Pinto

Souza Araujo: Os bacilos de Hansen e de Stefansky

ESTAMPA 5

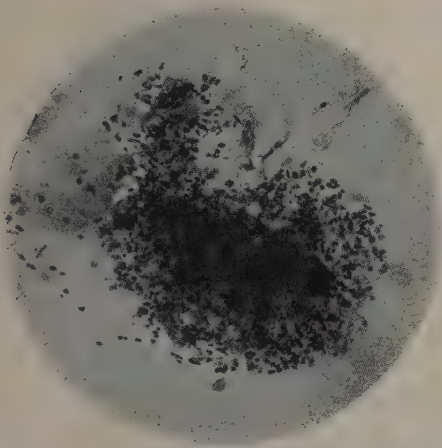
BACILO DE HANSEN

Fig. 1 — O esfregaço de material obtido por curetagem de erosão do septo nasal de O. J., mulher branca, de 28 anos, de Minas Gerais, feito a 9-7-41, revelou essa massa de germes ácido-álcool resistentes, onde predominam os cocóides. A pele de O. J. está completamente limpa de lesões lepromatosas, após 5 anos de tratamento regular.

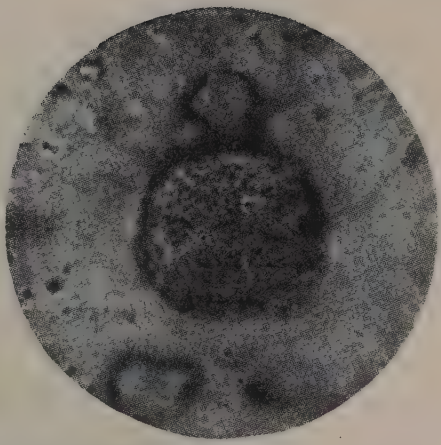
Fig. 2 e 3 — Esfregaços de material obtido por curetagem de erosões do septo nasal do doente J. F., de 43 anos, branco, natural de Minas, com a pele negativada após 3 anos de tratamento regular. O exame feito a 5-6-41 revelou uma bola de elementos cocóides a.a.r. bem delimitada e uma massa informe de elementos bacilares e cocóides idêntica à da figura 1.

Fig. 4 — Esfregaço de material de pústula produzida pela diatermo-coagulação na planta do pé de A. E., homem branco, de 30 anos, do R. G. do Sul. Trata-se duma globia de poeira a.a.r. semelhante à figura 6 da Estampa publicada em 1886 por Adolpho Lutz.

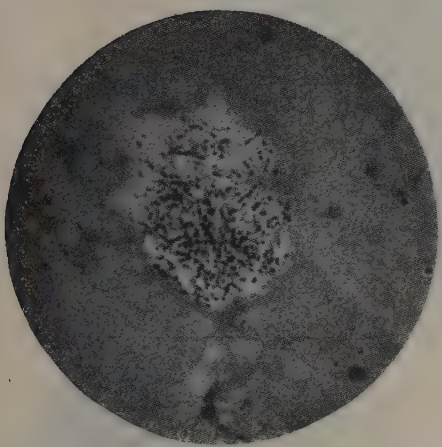
Fig. 5 e 6 — Esfregaços de pus de gânglios inguinais de Geraldo V., branco, 27 anos, de S. Paulo, material colhido a 10-8-39 após algumas injeções intraganglionares de esteres de Cahulmoogra. Veem-se globias de granulos a.a.r.



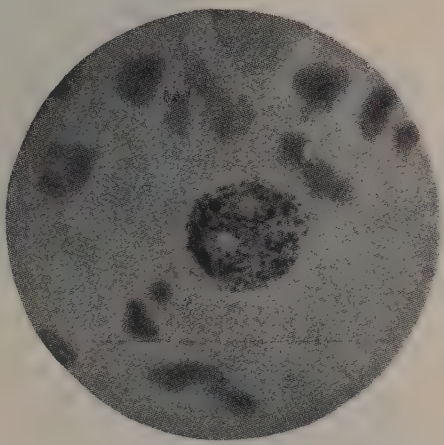
1



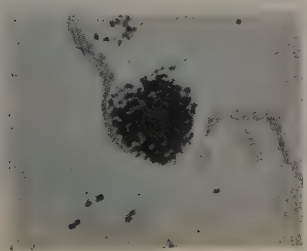
2



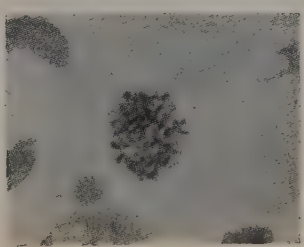
3



4



5



6

Fotos J. Pinto

Souza Araujo: Os bacilos de Hansen e de Stefansky

ESTAMPA 6

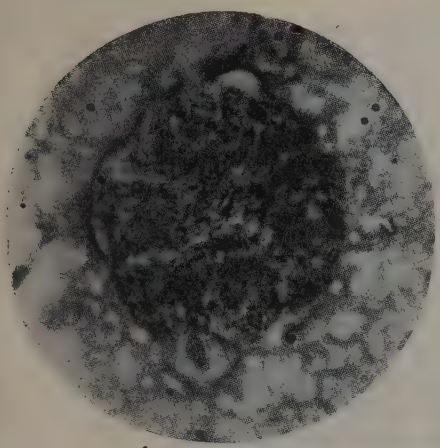
BACILO DE HANSEN

Fig. 1 — Esfregaço de emulsão fresca de leproma extirpado do dorso da mão direita do doente Angelo G., branco, de 30 anos, natural de S. Paulo, operado a 8-3-41 pelo Prof. Pedro Moura.
Vê-se aí uma globia gigante de bacilos homogêneos.

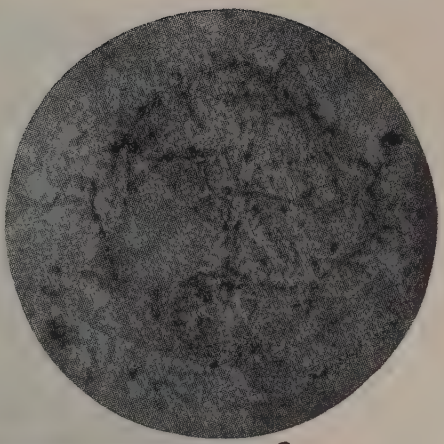
Fig. 2 e 3 — Esfregaços de serosidade citrina obtida durante vários dias após a operação do doente acima, contendo bacilos de Hansen no mais adiantado grau de degeneração, porem sempre ácido-álcool resistentes. A célula da fig. 3 apresenta quase só detritos bacilares.

Fig. 4 — Esfregaço de gânglio inguinal do 4.º rato do Lote 16, inoculado a 8-3-41 com emulsão fresca do leproma de A. G., o qual morreu 6½ meses após a inoculação. Os bacilos se apresentam homogêneos (x 2.000) e bem corados, prova de que tiveram no animal aumento de vitalidade.

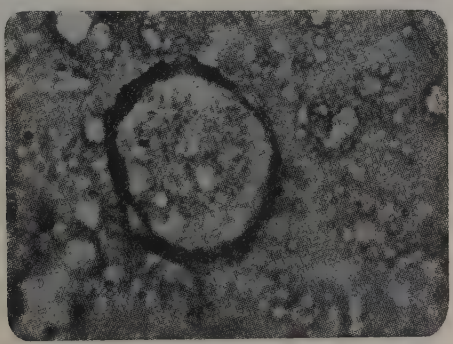
Fig. 5 — Esfregaço de outro gânglio inguinal do 4.º rato do Lote 16, inoculado a 8-3-41 com emulsão do leproma de A. G. e morto a 23-10-41, no qual esfregaço se veem tambem só bacilos homogêneos.
Com emulsão desses gânglios inoculei outro lote de ratos.



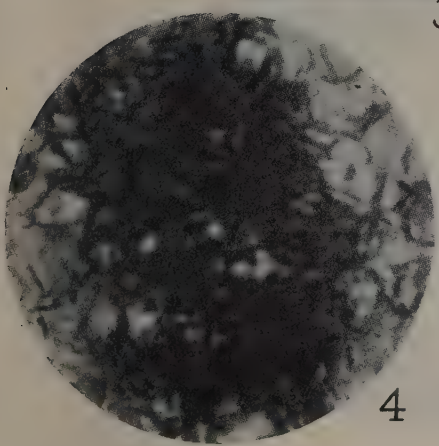
1



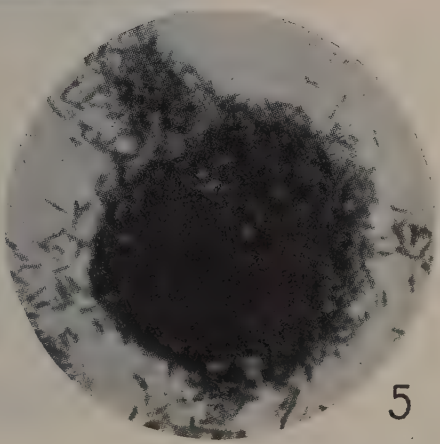
2



3



4



5

Fotos J. Pinto

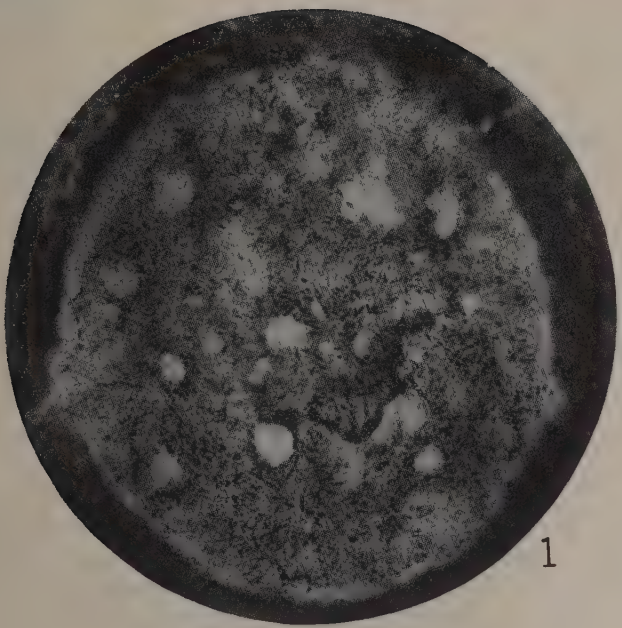
Souza Araujo: Os bacilos de Hansen e de Stefansky

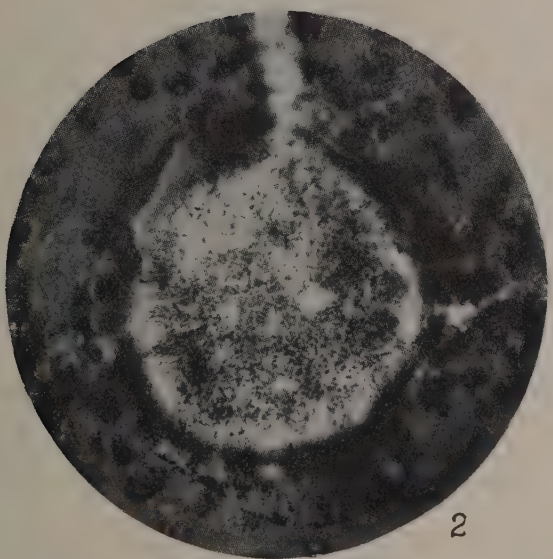
ESTAMPA 7

BACILO DE HANSEN

Fig 1 e 2 — Esfregaços de massa caseosa obtida por incisão galvacaustica dum abcesso do nervo periférico do antebraço esquerdo do doente J. F., branco, de 35 anos, natural de Goiaz. Esse material continha inumeras grandes celulas vacuolares e multinucleares, com massas de bacilos pleomorficos, desde os elementos homogêneos até à poeira ácido-álcool resistente.

A fig. 1 assemelha-se à celula ganglionar da medula de leproso, figura publicada por Kolle e Hetsch na Estampa 41 do seu tratado de Bacteriologia Experimental, 4.ª edição francesa (1918).





Fotos J. Pinto

Souza Araujo: Os bacilos de Hansen e de Stefansky

Estudo do ciclo evolutivo do "Schizotrypanum Cruzi" em cultura de tecidos de embrião de galinha *

por

C. Romaña e H. Meyer

(Com 6 estampas)

Notícia: O presente trabalho é o resultado da estreita colaboração entre o Laboratório de Biofísica da Faculdade Nacional de Medicina e o Serviço de Estudo das Grandes Endemias do Instituto Osvaldo Cruz. Em 1939, quando procurava criar as secções que hoje constituem o Laboratório de Biofísica, foi, graças ao alto espírito de colaboração e à orientação de Evandro Chagas, que pude organizar a atual secção de cultura de tecidos do meu laboratório. Procurava Evandro Chagas auxiliar-me, certo de que no estudo das condições físico-químicas do desenvolvimento das culturas de tecidos poder-se-iam achar as bases para determinação dos elementos fundamentais que caracterizam a estrutura vital. Ao lado disso seria estudado o desenvolvimento em cultura dos agentes etiológicos das principais protozooses encontradas no nosso país.

Cumpre-se assim, com a publicação dêste trabalho, uma parte do programa que Evandro Chagas inspirou e orientou.

Nenhuma homenagem à sua memória será melhor do que esta.

Carlos Chagas.

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de *S. cruzi* em cultura de tecidos foi conseguido por Kofoid, Wood and McNeil (1) que empregaram coração de embriões de ratos e camondongos. Os autores citados observaram que o *S. cruzi* evolue nas culturas até à forma adulta como acontece naturalmente nos vertebrados.

* Recebido para publicação a 4 de março e dado à publicidade em abril de 1942.

Trabalho do Serviço de Estudos das Grandes Endemias do Instituto Oswaldo Cruz e do Laboratório de Biofísica da Faculdade Nacional de Medicina (Serviços do Prof. Carlos Chagas).

Puderam ver, 24 horas depois de contaminar as culturas de tecidos com *S. cruzi*, proveniente de culturas em tubos, numerosas formas flageladas aderidas pela extremidade posterior ou pelo flagelo livre à superfície de fibras musculares, fibroblastos e macrófagos, mas não observaram a penetração ativa de critídias ou T. metacíclicos nos elementos celulares. No entanto, viram de um a vários flagelados em movimento ativo no interior de muitos macrófagos.

Não foram observados parasitos nos fibroblastos, nem nas preparações a fresco, nem nas coradas. Os primeiros *S. cruzi* adultos apareceram ao quinto dia depois da inoculação.

Em cortes de culturas observaram formas de leishmanias e critídias em fibras musculares cardíacas quatro dias depois da contaminação, assim como um pequeno grupo de formas finas de *S. cruzi*.

Retomamos estes estudos com o fim de seguir o mais cuidadosamente possivel o ciclo evolutivo intracelular do *S. cruzi*, já conhecido em suas linhas gerais desde o tempo de Viana (1911), e de constatar a relação existente entre as células e o *Schizotrypanum*.

TÉCNICA

As culturas de tecido foram obtidas seguindo a técnica comum de Carrel, isto é, um fragmento de embrião de galinha foi colocado em partes iguais de plasma desta ave (dil. 1/5) e de suco de embrião da mesma origem centrifugado três vezes. Depois de mais ou menos 24 horas de incubação, foi colocada uma pequena gota de cultura de *Schizotrypanum* em tubo, sobre a superfície do coágulo ao nivel da cultura de tecido. As culturas assim contaminadas foram incubadas à temperatura de 38°-39° C. Estas não foram repicadas tão frequentemente quanto exige a clássica técnica de Carrel (3 vezes por semana); só foram repicadas de 5 em 5 dias ou, em certos casos, com menos tempo, de acordo com o tecido e o aspecto das culturas. Foram lavadas regularmente 3 vezes por semana com uma gota de líquido de Tyrode e uma gota de suco embrionário depositadas sobre a superfície do coágulo.

Com esta técnica o transplante que geralmente fica pouco transparente no centro e dificil de observar histologicamente, estende-se sobre a superfície e depois de um certo tempo torna-se claro, de modo que se pode com mais facilidade observar *in vivo* o que ocorre no interior das células, assim como nas preparações fixadas e coradas.

Nos casos em que a cultura estava prejudicada pelo excessivo desenvolvimento dos tripanosomas e morte das células, a cultura infectada era repicada com um fragmento de tecido novo ao lado e os parasitos colonizavam o novo

tecido. Nossa cultura mais antiga de *Schizotrypanum* em tecido vem sendo mantida, desta maneira, durante mais de 7 meses.

O *Schizotrypanum* é facilmente cultivado em tecidos de galinha, desenvolvendo-se no miocárdio, baço fígado, epitélio da iris e células do gânglio espinhal. Em todos estes tecidos ele parasita qualquer tipo de célula; fibrocitos, histiocitos, macrófagos, células musculares, epitélio pigmentado da iris, células do fígado, células nervosas e monocitos do sangue de galinha.

Para as contaminações do tecido usamos culturas em agar-sangue de *Schizotrypanum* de diversas procedências. Assim empregamos amostras isoladas de tatú, gambá, homem e morcego, que foram igualmente ativas na sua capacidade infectante, não se tendo observado diferenças no ciclo evolutivo.

Apresentando-se a oportunidade, foi usado sangue de cobaia contaminada com *S. cruzi* para infectar culturas de tecido, com resultado igualmente positivo.

As culturas, examinadas a fresco durante horas consecutivas foram geralmente fixadas em líquido de Bouin, de Patay, etc., e coradas com Giemsa, hematoxilina-eosina, hematoxilina-férrica, etc.

O CICLO EVOLUTIVO DO *SCHIZOTRYPANUM* NAS CULTURAS DE TECIDO

A observação de numerosas preparações a fresco e coradas nos leva a crer que tanto as formas crithidias como os T. metacíclicos teem capacidade infectante para as células de culturas de tecido. O mecanismo de entrada e evolução intracelular de ambas as formas é semelhante.

A penetração dos flagelados nas células pode ser ativa ou obedecer a um ato de fagocitose por parte de células macrófagas. Em geral a penetração ativa é mais visivel nos T. metacíclicos que nas crithidias, pois aqueles com sua grande motilidade atravessam facilmente as superfícies celulares. Temos observado a fresco os flagelados penetrando no protoplasma de fibroblastos e miocitos. O mais comum é vê-los sair de novo das células, pois parece necessário, para que o parasitismo se estabeleça, que os flagelados percam parte de seus movimentos ativos. Foi-nos possivel seguir a evolução de alguns destes flagelados intracelulares. Neles os movimentos ficam reduzidos à membrana ondulante e ao flagelo, o resto do corpo permanecendo praticamente imovel. Vinte horas depois de penetrado vemos o desaparecimento da membrana ondulante e um grande encurtamento do flagelo livre. Ao mesmo tempo, o corpo tambem se encurta, tornando-se mais globuloso e adquirindo uma forma semelhante à crithidia, no caso de penetração de tripanosomas. Algumas horas mais tarde já se apresentam sob a forma de leishmania.

Em preparações coradas é possivel observar que esta transformação é acompanhada nos tripanosomas de uma migração do blefaroplasto para a extremidade anterior do parasito, assim como da transformação daquele corpúsculo, de arredondado que era, em um pequeno bastonete. A partir deste momento, é dificil seguir a evolução dos flagelados a fresco, pois ocultam-se no protoplasma celular que apresenta uma refração semelhante à do protozoário. Aliás, os parasitos buscam especialmente as células do centro da cultura para penetrar nelas, sendo, por conseguinte, muito mais dificil sua observação a este nivel.

Nas culturas a fresco é possível, já aos 3 dias de infectadas, ver numerosas formas novas agrupadas no protoplasma das células parasitadas, que nas preparações coradas se apresentam como leishmnias, entre as quais acha-se bom número em diferentes estádios de divisão binária. (Figs. 1 e 2).

Observa-se em preparações coradas que as leishmanias e critídias intracelulares estão rodeadas por uma zona protoplasmática clara. Isto nos levou a pensar que houvesse uma retração dos protozoários durante a fixação; mas tambem observamos o mesmo fenômeno a fresco. E', pois, possivel que exista uma lise protoplasmática ao redor dos parasitos. Este fenômeno pode ser bem apreciado nas células com protoplasma delgado e laminar.

A multiplicação torna-se mais pronunciada nos dias subsequentes ao terceiro, e a atenção é chamada para os ninhos parasitários pelo fato de começar a aparecer movimento em alguns dos protozoários, pois enquanto permanecem imoveis é dificil diferenciá-los do protoplasma celular. Entre o 3.º e 4.º dias veem-se numerosos parasitos com formas de critídias com flagelo já bem desenvolvido. A divisão binária tambem pode ser observada em formas já flageladas (critídias). Nunca foram observadas formas que fizessem suspeitar uma divisão múltipla, nem tripanosomas em divisão.

Os movimentos dos flagelados intracelulares são cada vez mais ativos até à célula completamente cheia de parasitos só mostrar tripanosomas em movimento. Nas lâminas coradas observa-se a transformação das formas critídias em tripanosomas com migração do blefaroplasto à parte posterior do corpo e o desenvolvimento da membrana ondulante. (Fig. 3).

Ao 4.º dia já podem aparecer alguns tripanosomas livres, mas em geral é no 5.º dia que se observam os primeiros. Passam ao meio externo graças à ruptura brusca da célula que os contem. Neste momento pode-se observar, junto a formas que chegaram ao desenvolvimento completo de tripanosomas, outras que ainda estão em forma de critídias, ou mesmo de leishmanias. Ao se romperem as células parasitadas são lançados no meio externo junto com os tripanosomas restos celulares de núcleo e protoplasma. Entre as critídias

incompletamente desenvolvidas quando as células maduras se rompem, há algumas que estão no período de divisão e outras em transformação para tripanosomas. Estas formas, quando chegam ao meio intracelular, podem completar sua evolução até tripanosomas. Não parece se dar o mesmo com as formas leishmanias libertadas, que, em observações de 48 horas, não conseguimos ver transformar-se em critídias, e que nas lâminas coradas mostram sintomas de degeneração.

Na parte central das culturas são observados dentro dos miocitos e fibroblastos verdadeiros ninhos de protozoários que, chegados à madureza, arrebentam; rompem-se às vezes mesmo antes de maduros, quando os parasitos ainda estão sob a forma de leishmania. Na zona de crescimento das culturas veem-se fibrocitos ou células epiteliais parasitadas extendidas em superfície plana (Fig. 4), mas é frequente observarem-se células esféricas, livres, cheias de flagelados, (Fig. 5). Estes elementos livres formam-se como resultado de uma espécie de broto nas células fixas que libertam um segmento de protoplasma contendo flagelados. Em outros casos, estas formações resultam da retração de fibroblastos parasitados que bruscamente adquirem a forma esférica. Estes elementos celulares livres rompem-se mais tarde, pondo em liberdade os tripanosomas que continham.

Os tripanosomas adultos que saem das células são de dois tipos, semelhantes aos que se encontram na corrente sanguínea dos vertebrados; alguns são finos e compridos enquanto que outros são largos (Fot. 6, 7 e 8). Desde o princípio observam-se ambas as formas nas culturas, e ainda intracelulares. Os tripanosomas finos mostram um tipo de movimento de progressão ondulatória em linha reta semelhante ao dos T. metacíclicos, enquanto que as formas largas teem o movimento sobre si mesmo.

E' interessante recordar que C. Chagas deu a este dimorfismo um carater sexual; a união dos gametos teria lugar no hospedador intermediário. Atualmente não existem observações que confirmem este ponto de vista. A maior parte dos autores opina que as formas finas se transformam em formas grossas, baseando-se no fato de encontrarem no sangue tripanosomas com morfologia intermediária entre ambas. Ainda mais, sabe-se que as formas finas são mais frequentes no começo das infecções. De nossas observações em culturas de tecidos, pensamos que é necessário aprofundar o estudo da origem de ambas as formas, para esclarecer definitivamente se as formas largas derivam das finas.

O relato que acabamos de fazer da evolução do *S. cruzi* nas culturas de tecido está em acordo com a descrição clásica dada por Gaspar Viana em seus primeiros trabalhos de histopatologia da tripanomíase (2), confirmados por

E. Dias (3). Entretanto, temos observado tambem, com grande constância, certos aspectos da evolução do *S. cruzi* cujo significado ainda não vemos claramente e que continuamos a observar, mas que cremos de interesse relatar.

Em numerosas culturas de tecido infectadas com *S. cruzi* procedentes de culturas em agar-sangue ou de outra cultura de tecido, vimos que critídias ou tripanosomas depois de penetrar nas células ou no meio externo, se enrolam sobre si mesmos adquirindo, nas preparações coradas, o aspecto de leishmanias. Em certos casos este fenômeno ocorre já 15 minutos depois da contaminação. Temos observado tambem o mesmo fato com tripanosomas originários da mesma cultura, os quais tambem se enrolam dentro ou fora das células. (Fig. 9). Pareceria que as formas intracelulares sofrem involução para leishmanias nesta posição enrolada, seguindo mais tarde o ciclo evolutivo já descrito. As formas extracelulares parecem degenerar e morrer.

Tambem ao fim da evolução dos tripanosomas em certas células especialmente nas aglomerações formadas na parte central do tecido, observam-se formas arredondadas de leishmanias que rapidamente se transformam em tripanosomas adultos aparentemente por um desenvolvimento do flagelo sem migração do blefaroplasto, seguido do desenrolamento do protozoário sem que se possa observar a fase intermediária clássica de critídia.

Mayer e Rocha Lima (4) já observaram e descreveram em cortes histológicos esta fase final na evolução do *S. cruzi* em animais.

Conseguimos a infecção de um camondongo inoculando-o por via subcutânea com cultura de tecido rica em formas adultas de *S. cruzi*. A infecção revelou-se 14 dias depois da inoculação. A amostra empregada era de origem humana.

Uma cobaia, inoculada com *Schizotrypanum* originário de gambá e mantido permanentemente durante seis meses em cultura de tecido, mostrou-se infectada depois de 30 dias de inoculada. Este fato demonstra que pode manter-se nas culturas a virulência do *Schizotrypanum* durante longo período de tempo.

RELAÇÃO ENTRE AS CÉLULAS E O *S. CRUZI*

Alem da penetração ativa dos flagelados no protoplasma celular pode-se tambem observar fenômenos de fagocitose exercidos sobre critídias por parte de células macrófagas. Em culturas recentemente contaminadas observa-se que numerosas critídias ficam aderidas pela extremidade posterior à superfície dos macrófagos, como já foi notado por Kofoid e seus colaboradores. Conside-

ramos este fenômeno de adesão puramente acidental, pois há tambem critídias presas a outros elementos celulares ou inanimados. Naturalmente o fenômeno de adesão aos macrófagos deve ser favorecido pelas condições físicas destas células e especialmente da membrana ondulante que apresentam. Uma vez aderidas as critídias, produz-se englobamento progressivo pela membrana ondulante, até a fagocitose total do protozoário. Observamos tambem o começo da fagocitose sobre um T. metacíclico com adesão e englobamento parcial, mas o tripanosoma se libertou posteriormente graças a seus movimentos ativos.

Certos macrófagos podem fagocitar uma grande quantidade de critídias, formando verdadeiras aglomerações de parasitos. Estas células entram em degeneração e morrem junto com os flagelados nelas contidos. Outros macrófagos que se veem especialmente em culturas de baço e que fagocitam poucas critídias, terminam por destruí-las, o que se observa pela fragmentação do núcleo e do blefaroplasto, sem que a célula apresente fenômenos degenerativos (Fig. 10). Ainda em outros macrófagos deste mesmo tipo as critídias permanecem vivas, se transformam em leihmanias e começam a se multiplicar (Fig. 11).

Em geral os miocitos e fibroblastos parasitados no começo da infecção não apresentam fenômenos degenerativos. Os primeiros, ainda contendo grandes ninhos de multiplicação, continuam a se contrair. Somente se observa um ritmo mais acelerado que o normal, como se estivessem excitados pela presença de flagelados. Mas depois da ruptura da fibra, como acontece com as outras células, degeneram e morrem. Quanto aos fibrocitos, estes podem emigrar normalmente da parte central até à periféria da cultura, levando no seu protoplasma leishmanias em multiplicação.

Por outro lado, esta tolerância das células pelos flagelados nelas contidos já havia sido observada pelos anatomo-patologistas, especialmente ao nível das fibras miocárdias, nas quais não se encontram fenômenos degenerativos, enquanto os ninhos parasitários estão íntegros. A tolerância tambem é manifestada quando se observam nas culturas células com fenômenos de cariocinese, contendo parasitos no protoplasma.

Foi-nos possivel observar que quando as culturas entram em degeneração os parasitos intracelulares tambem morrem (Fig. 12); este fato, unido à incapacidade das formas leishmanias de evoluir até à forma de tripanosoma quando são extracelulares, pareceria demonstrar a necessidade da vida celular para que se realize certa parte do ciclo evolutivo do *Schizotrypanum* durante a fase de parasitismo nos tecidos dos vertebrados.

RESUMO

Culturas de tecido de embrião de galinha foram contaminadas com *Schizotrypanum* de diversas procedências. Serviram como material de contaminação, culturas em tubos de agar-sangue e em um caso sangue parasitado de cobaia.

Os transplantes de tecidos foram mantidos em cultura de acordo com a técnica de Carrel, ligeiramente modificada.

Os tecidos usados foram baço, miocárdio, fígado, epitélio da iris, gânglio espinhal e monocitos do sangue de galinha adulta.

Em todos estes tecidos o *Schizotrypanum* foi facilmente cultivado, parasitando os diferentes tipos de células existentes: fibroblastos, histiocitos, macrófagos, células epiteliais, células nervosas, etc.

Os autores puderam seguir o ciclo completo do parasito, confirmando os conhecimentos clássicos da sua evolução no tecido: transformação em leishmânia, multiplicação por divisão binária, transformação em critídia e finalmente em tripanosoma adulto.

Tambem observaram formas parasitárias que aparentemente evoluiram diretamente da forma de leishmânia à de tripanosoma, sem passar por critídia.

Conseguiu-se a infecção de um camondongo inoculado com *S. cruzi* de origem humana passado por cultura de tecidos.

Os autores tambem estudam diferentes fenômenos observados nas relações entre as células e os parasitos.

SUMMARY

Chick embryo tissue cultures were smeared with *Schizotrypanum* from different sources. The cultures were inoculated with flagelates from blood-agar cultures and in one instance from blood of an infected guinea-pig.

Carrel's technique of tissue culture, with slight modifications, was employed.

The tissue used were spleen, myocardium, liver, epithelium of the iris, spinal ganglion and monocytes from chicken blood.

In all these tissues the flagellate developed easily, parasitizing different types of cells: fibroblasts, histiocytes, macrophages, epithelial cells, cells of the nervous system, etc.

The authors were able to follow the complete cycle of the parasite, observing its classic evolution: transformation into leishmania, multiplication by binary division, transformation into crithidia and finally into trypanosome.

They also observed forms of the parasite which possibly developed directly from leishmania to trypanosome without apparently going through the crithidia stage.

They succeeded in infecting a white mouse with a human strain of *S. cruzi* after passage through tissue culture.

The authors also pointed out different phenomena observed in the relations between the cells and the parasites.

REFERÊNCIAS

Kofoid C. A., Wood F. C. and Mc. Neil E.

1935. The cycle of trypanosoma cruzi in tissue culture of embryonic heart muscle — University of California Publications in Zoology. Vol. 41, N.° 3, p. p. 23-24.

Vianna, Gaspar.

1911. Contribuição para o estudo da anatomia patológica da "Moléstia de Carlos Chagas" — Mem. Inst. "Oswaldo Cruz", t. III, N.° 2, p. 276.

Dias, Emmanuel.

1934. Estudos sobre o *Schizotrypanum cruzi* — Mem. Inst. "Oswaldo Cruz", t. XXVIII, N.° 1, p. 1.

Mayer, Martin, da Rocha Lima, H.

1914. Zum Verhalten von *Schizotrypanum cruzi* in Warmblütem und Arthropoden. Arch. f. Schiffs. u. Tropenhyg., 18, Beth, 257.

ESTAMPA 1

Fig. 1 — *Cult. 149*. — Baço — Infecção de 3 dias — Fixador Bouin — Colaboração Hematoxilina férrica — Critídias — Seta: leishmania em divisão binária.

Fig. 2 — *Cult. 149*. — Baço — Infecção de 3 dias — Fixador Bouin — Coloração Hematoxilina férrica — Formas leishmanias e critídias no protoplasma de um macrófago — Seta: leishmanias em divisão binária.

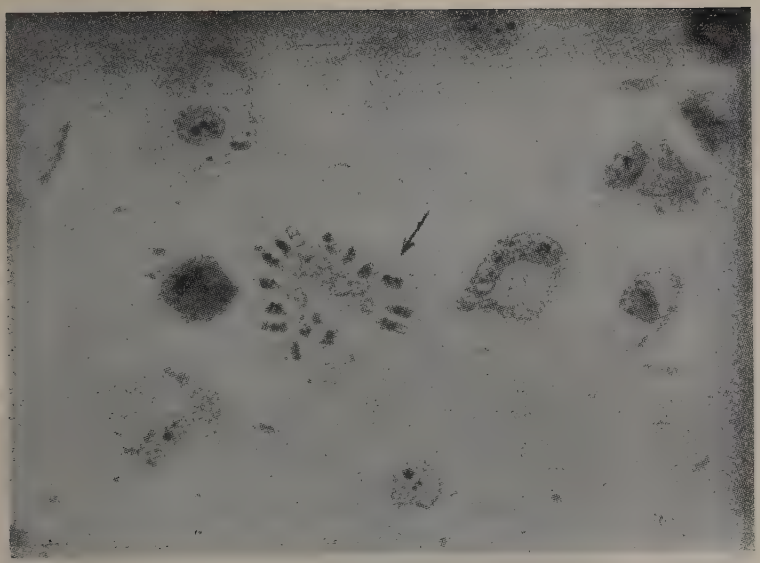


Figura 1

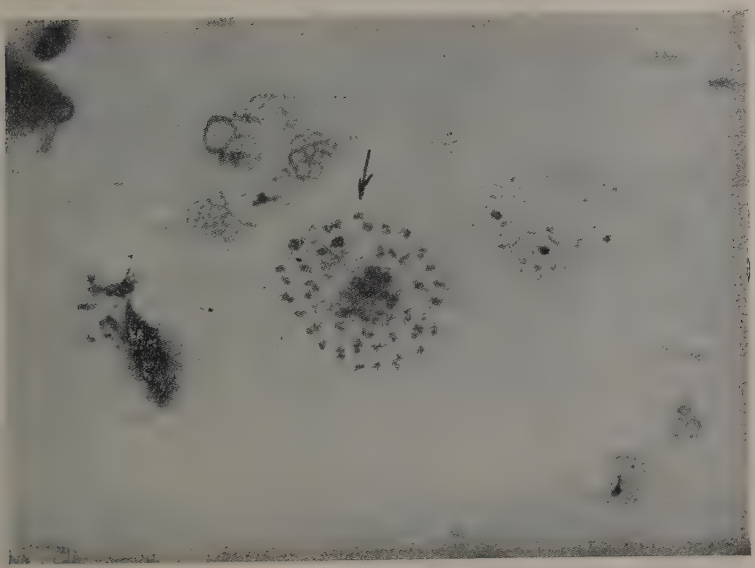


Figura 2

Romaña e Meyer: Cultura de S. cruzi

ESTAMPA 2

Fif. 3 — *Cult. 140*. — Baço — Infecção de 18 dias — Fixador Bouin — Coloração Giemsa — Fibroblasto contendo numerosas formas leishmania e critídia de *Schizotrypanum*.

Fig. 4 — *Cult. 319*. — Fígado — Infecção 20 dias — Fixador Bouin — Coloração Giemsa — Células epiteliais do fígado parasitadas.

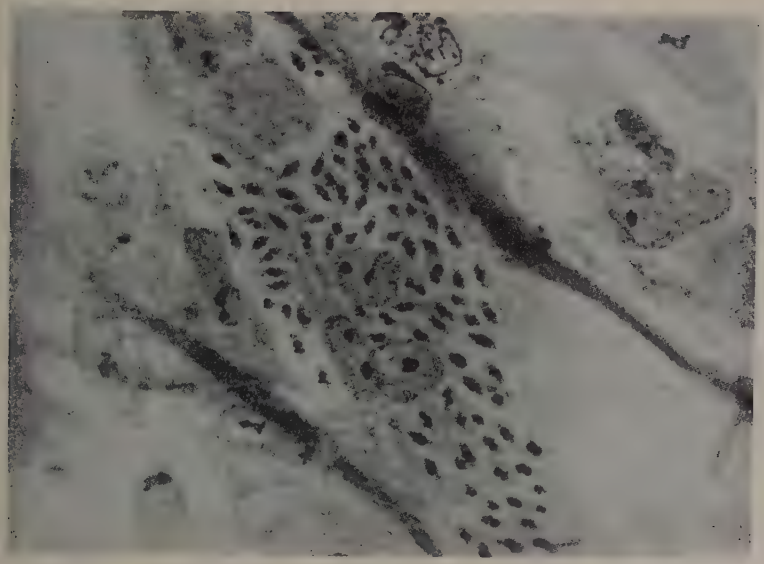


Figura 3

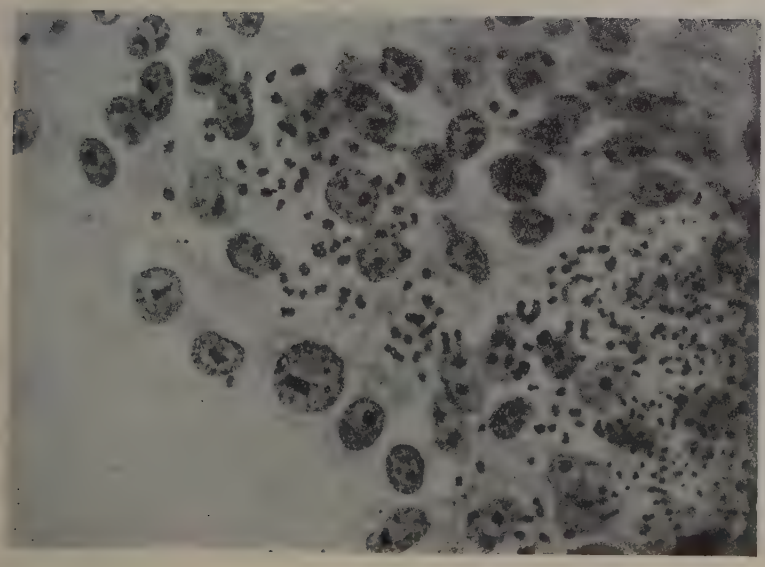


Figura 4

Romaña e Meyer: Cultura de S. cruzi

ESTAMPA 3

Fig. 5 — *Cult. 122.* — Baço — Infecção de 5 dias — Fixador Bouin — Coloração Hemat. férrica — Célula esférica parasitada resultante da retração de um fibrocito — Formas enroladas livres de *Schizotrypanum*.

Fig. 6 — *Cult. 319.* — Figado — Infecção 20 dias — Fixador Bouin — Coloração Giemsa — Forma lina, livre de *Schizotrypanum*.

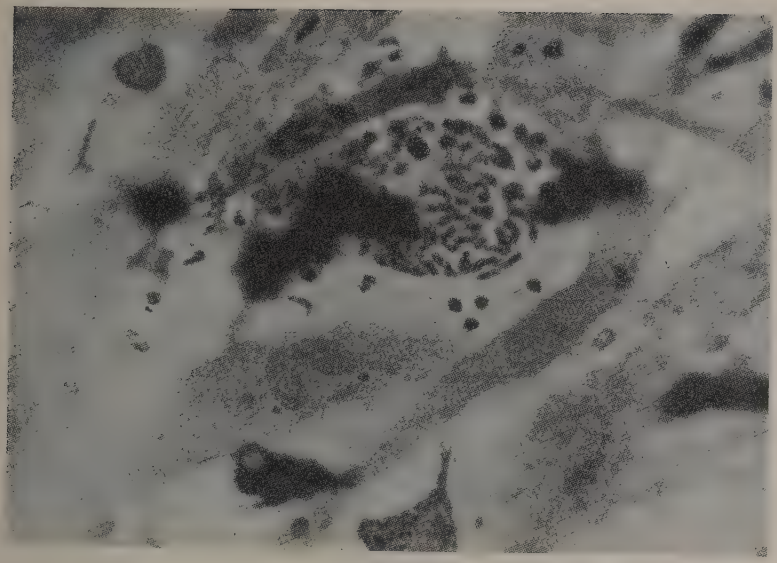


Figura 5

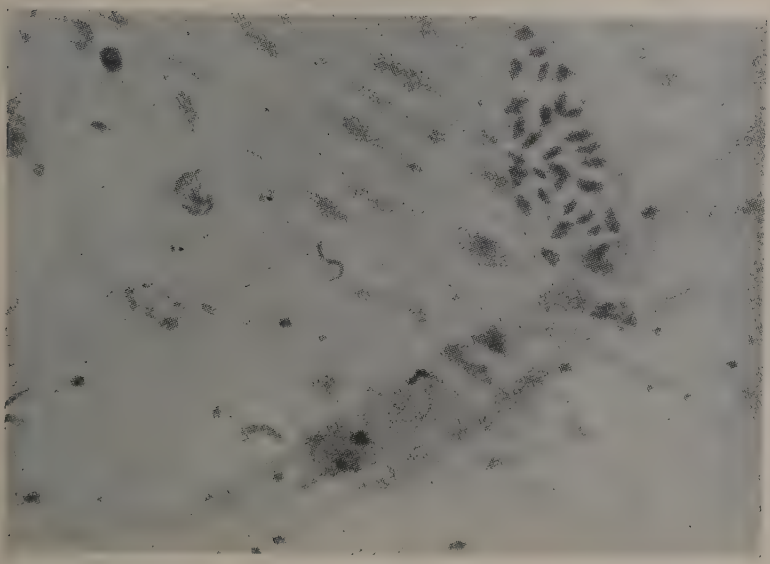


Figura 6

Romaña e Meyer: Cultura de S. cruzi

ESTAMPA 4

Fig. 7 — *Cult. 319*. — Fígado — Infecção de 20 dias — Fixador Bouin — Coloração Giemsa — Formas largas de *Schizotrypanum*.

Fig. 8 — *Cult. 327*. — Fígado — Infecção 12 dias — Fixador Bouin — Coloração Hematoxilina eosina — Célula com numerosas formas de tripanosoma.

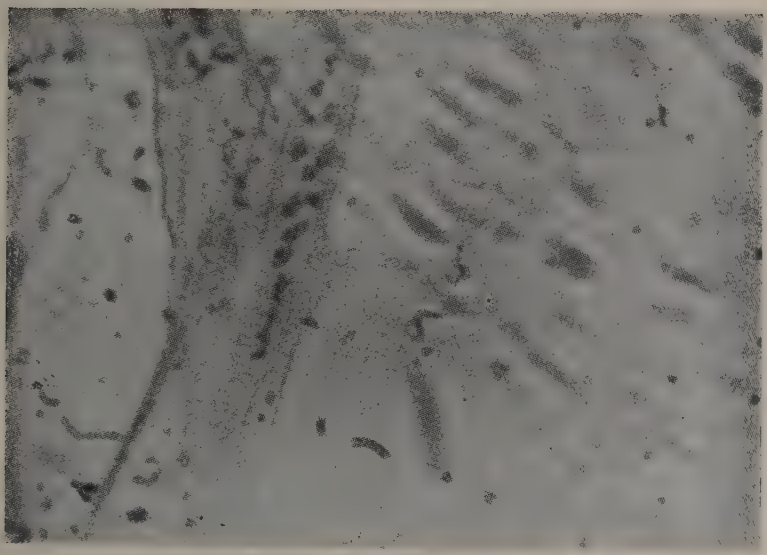


Figura 7

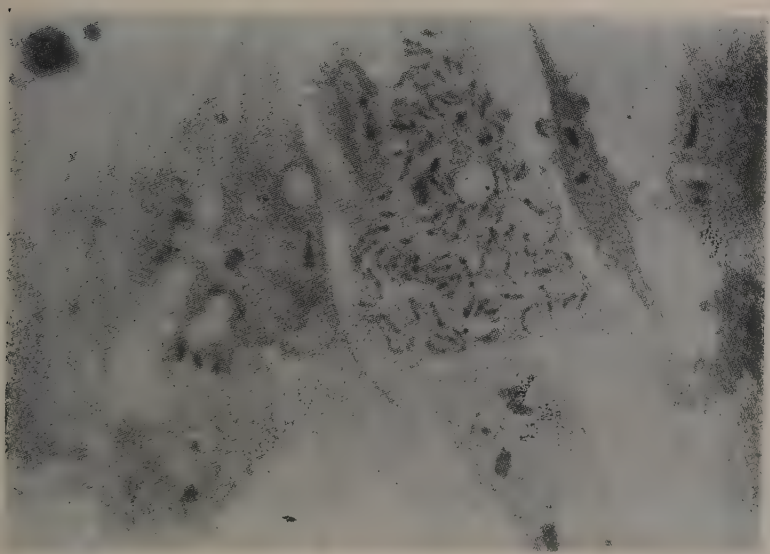


Figura 8

Romaña e Meyer: Cultura de S. cruzi

ESTAMPA 5

Fig. 9 — *Cult. 137*. — Baço — Infecção de 24 horas — Fixador Bouin — Coloração Giemsa — Tripanosomas intracelulares e extracelulares enrolados, depois de 24 horas de contacto entre tecidos novo e antigo — (Célula nova).

Fig. 10 — *Cult. 147*. — Baço — Infecção de 72 horas — Fixador Bouin — Coloração Hematoxilina férrica — Macrófagos com numerosos flagelados em degeneração.

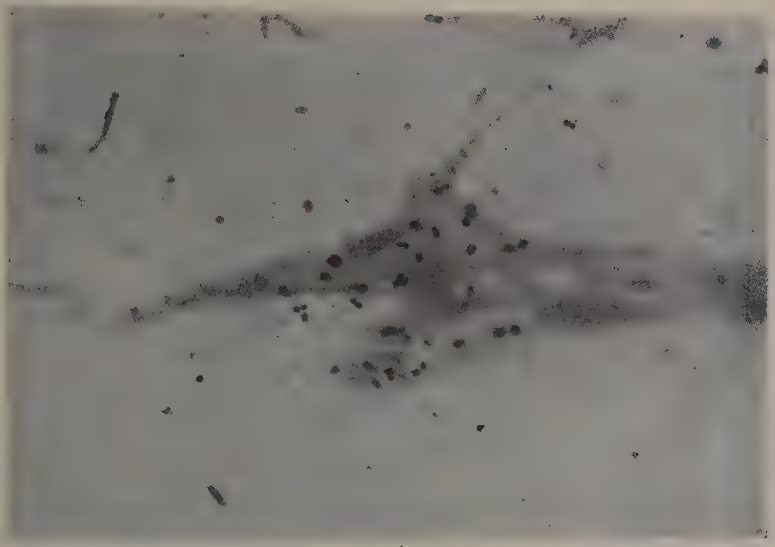


Figura 9

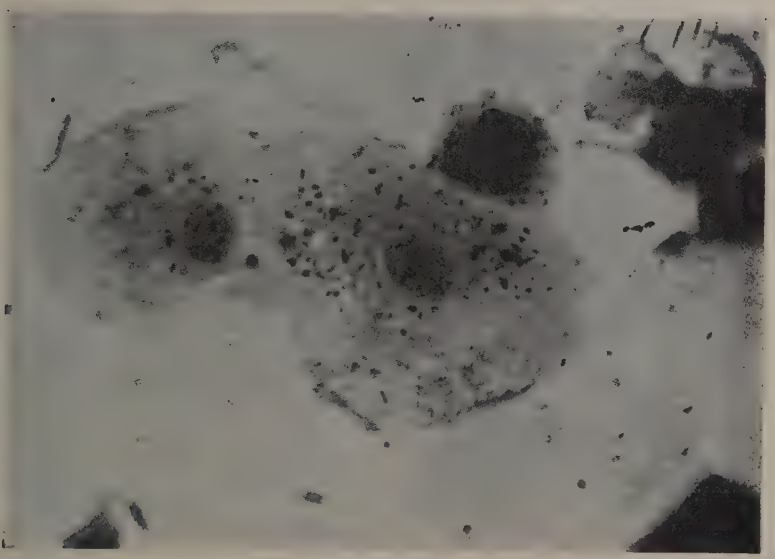


Figura 10

Romaña e Meyer: Cultura de S. cruzi

ESTAMPA 6

Fig. 11 — *Cult. 147*. — Baço — Infecção de 72 horas — Fixador Bouin — Coloração Hematoxilina férrica — Macrófago com critídias involuindo para leishmanias — Macrófago com critídias destruidas.

Fig. 12 — *Cult. 77*. — Baço — Infecção 5 dias — Fixador Bouin — Coloração Giemsa — Células e leishmanias em degenaração.

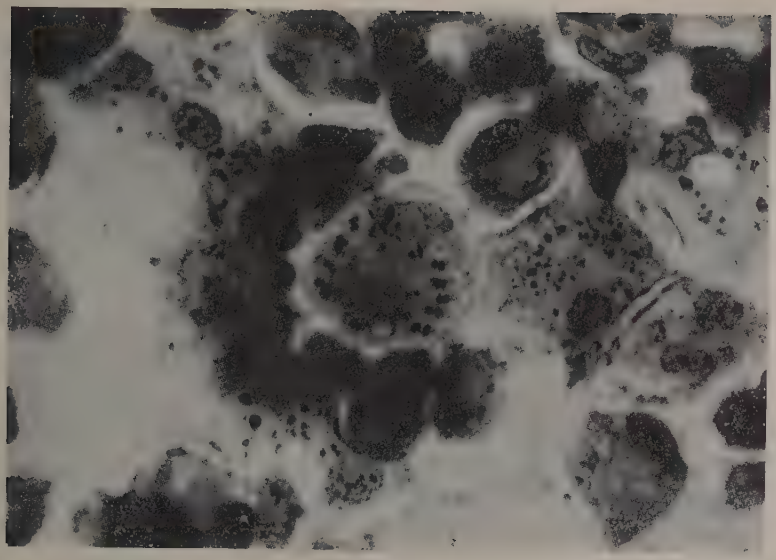


Figura 11

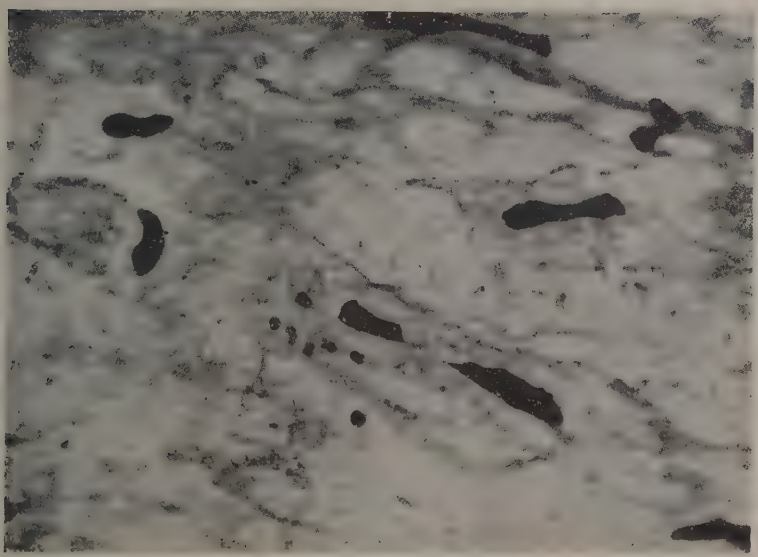


Figura 12

Romaña e Meyer: Cultura de S. cruzi

Cultura cromogênica dum bacilo ácido-álcool resistente isolado de pus de lesão fechada de lepra humana *

pelo

Dr. H. C. de Souza-Araujo

(Com 1 estampa colorida e outra em negro)

No dia 24 de Setembro de 1941 foi-me trazido à consulta o menino José J. F., branco, com 7 anos de idade, natural do Piauí, de onde acabava de chegar. O seu pai, L. F. P., é leproso, tendo a sua doença se manifestado em 1932 por dormência na região maleolar direita, que se estendeu, em 1933, à mão e pé esquerdos e à região cubital direita. Em 1934 o Dr. Candido Silva diagnosticou-lhe lepra. Em 1938 examinei-o pela primeira vez: era um caso L2-N2. Atualmente tem ele 57 anos de idade e está bastante melhor do seu mal, já tendo tido alguns exames negativos.

A mãe de José, Z. F. F., tem 48 anos de idade, é tambem leprosa e provavelmente foi contaminada pelo seu marido. Foi em 1939 que lhe apareceu o 1.º sintoma: uma mácula na região malar direita, seguida logo de outras nas coxas, sendo hoje um caso L2.

Os outros 5 filhos do casal são considerados como indenes do mal.

José, aos 2 anos de idade, em 1936, apresentava uma mácula discrômica no terço superior da coxa direita, que ainda existe, hoje contornada por uma grande zona eritematosa. O exame feito nele em fins de setembro do ano passado revelou infiltração nas faces, com inúmeros pequenos lepromas incipientes; infiltração moderada das orelhas, com um grande leproma na parte superior do pavilhão direito; rarefação dos supercílios, menos acentuada nos cílios.

Nos braços, nádegas, coxas e pernas apresentava inúmeras máculas circulares, purpuráceas, do nivel da pele normal e de tamanho variando entre

* Recebido para publicação a 4 de março e dado à publicidade em abril de 1942.

um quarto a um centímetro de diâmetro, flutuantes ao tacto. As mais negras e mais flutuantes foram abertas com a ponta do galvanocautério, revelando tratar-se de pústulas. O pus era pura massa de bacilos de Hansen. As figuras 3 e 4 da estampa 1 mostram o aspecto microbiano desse rico material.

Tinha ainda José os gânglios inguinocrurais hipertrofiados e alguns elementos ulcerados acima dos calcanhares. A figura 1 da estampa 1 é uma fotografia do paciente, tirada meio ano depois do 1.º exame, em que ele aparece em melhor estado geral e com as lesões cutâneas reduzidas em número. Os pontos negros que aí se veem assemelham-se às primitivas pústulas. Entre esses elementos surgiram lepromas chatos, de centro deprimido, como se tivessem sido papulas. José é hoje um caso L2.

PESQUISAS EXPERIMENTAIS

No dia 2 de outubro de 1941 colhi cerca de 4 c.c. de pus de 10 pústulas abertas com o galvanocautério, que distribuí em tubos de hemolise esterilizados. Semeei esse pus, *in natura*, em 9 tubos de meio de Loewenstein fresco e com o restante fiz uma emulsão que inoculei em 2 cobaias (Lote 27) na virilha direita e em 3 ratos brancos (Lote 28) na axila direita, na dose de 1 c.c. de emulsão rica em bacilos por animal.

Com a serosidade que escorria das lesões, após a colheita do pus, por expressão, fiz inúmeros esfregaços que serviram para demonstração na aula que nesse dia realizei na Clínica Dermatológica da Faculdade Nacional de Medicina. Esses esfregaços foram distribuidos aos alunos do 4.º ano médico.

No dia 9 de Outubro fiz nova colheita de pus para o Dr. J. G. Lacorte, que o semeou 4 dias após, e a 24 mais outra colheita para o meu assistente, Dr. H. Linhares, que o semeou em meios anaeróbios, em prosseguimento a pesquisas que vem fazendo. Até esta data os resultados estão negativos.

No dia 26 de Novembro abrí novas pústulas do paciente e colhí material que semeei em nova serie de Loewenstein, único meio adotado nestas pesquisas por ter sido o que me deu melhores resultados nas várias pesquisas de 1941.

No dia 15 de Dezembro verifiquei uma abundante cultura cromogênica em 3 tubos dos semeados em 2/10 e menos exuberante em 2 dos tubos semeados em 26/11. Os demais tubos estavam estereis. Verificando tratar-se duma cultura pura de germes ácido-álcool resistentes, repiquei-a em novos tubos de Loewenstein.

No dia 18 fiz a última colheita de pus, com o qual fiz mais uma serie de semeaduras e inoculei mais 3 ratos brancos (Lote 32).

A fotografia 2 da estampa 1, apesar de imperfeita, dá uma idéia do aspecto granuloso das culturas originais, como se apresentavam a 20 de Dezembro e a microfoto n. 5, da mesma estampa, mostra uma massa de germes, todos a.a.r., predominando os cocciformes, em esfregaço duma cultura original, semelhantes ao *Mycobacterium pulviforme* descrito por Marchoux em 1923. O esfregaço apresenta campos pleomórficos, onde se veem bacilos isolados, em pequenos feixes e cocoides de 2 a 2 e em grupos ou em massas. Aquí e ali raros pares de bacilos corados intensamente. A 15 de Fevereiro de 1942 um reexame das culturas revelou que a original de 2/10/41 em Loewenstein continua pura, a maior parte de um amarelo cor de ouro e uma zona alaranjada.

A original de 26/11/41 em Loewenstein está exuberante, granulosa, idêntica à de Kedrowsky ou de Duval em agar glicerinado, porem mais cromogênica, de cor alaranjada. Os tubos da 2.ª geração proveniente da original de 2/10 apresentam-se mais exuberantes que aquela, de um amarelo uniforme como se vê na figura 1 da estampa 2, desenho feito a 15 de fevereiro pelo Sr. Raymundo Honorio. A 2.ª geração proveniente da original de 26/11, semeada em Loewenstein a 15/12 não se desenvolveu com a exuberância anterior: apresenta delgada camada amarela de um granuloso fino como areia.

As repicagens feitas a 13/2/42 da original de 26/11/41 em meios glicerinados, a 28/2 apresentavam os seguintes caracteres: (15 dias): *Batata glicerinada a 5%* — Germinação semelhante à dos outros *Mycobacteria* isolados de lepra: camada granulosa, dum amarelo claro magnifico, como se vê no desenho 2 da estampa 2. A água glicerinada permanece límpida, característico de cultura pura. No esfregaço desta cultura predominam as formas bacilares, como se vê no desenho 2 A.

Caldo glicerinado a 5% — Formação do característico veu pregueado, de cor amarela, cobrindo a superfície do meio, que se mantem límpido, e subindo 1 centímetro pela parede do tubo, como se vê no desenho 3 da estampa 2. No fundo do tubo há um depósito de veus que foram caindo sem se desfazer. No esfregaço do veu predominam os bacilos homogêneos como se vê no desenho 3A da estampa 2.

Agar glicerinado a 5% — Como este meio estivesse seco na ocasião da semeadura, a germinação nos 3 tubos dele não foi exuberante como acontece com os *Mycobacteria* clássicos, mas a cultura continúa com o seu aspecto original: granulosa e amarela.

700.272 — F. 7

Os três lotes de animais inoculados com pus de José foram re-examinados a 27 de Fevereiro. Do lote 28, de 2/10/41, um rato apresentava extensas zonas de alopécia. Foi sangrado no coração até à morte e o sangue semeado em Loewenstein. A necrópsia revelou edema axilar, no lado da inoculação, hipertrofia dos gânglios e magreza.

Os esfregaços do edema, do gânglio axilar e do fígado revelaram raros bacilos a.a.r. e os demais orgãos deram resultado negativo, assim como o sangue. Os outros animais inoculados continuarão em observação.

A cultura em caldo glicerinado vai ser emulsionada e inoculada em ratos brancos e cobaios.

SUMMARY

Chromogenic culture of an acid-fast organism isolated from human leprosy

Last October 2nd the Author smeared nine tubes of Loewenstein medium with material obtained from closed pustulae of a seven years old boy, L2 case of leprosy. This material was very rich in Hansen bacilli in its different forms, inclusive globus, as is seen in the figures 2 and 3 of Plate 1. Part of this material obtained from pustulae opened by galvanocautery, was inoculated, at the same day, into white rats and guinea-pigs.

November 26th a new biopsy gave more rich material, which was smeared again into Loewenstein fresh medium.

December 15th three of the first and two of the second series of tubes of cultures showed germination of a yellow, dry and rough culture, covering almost the total surface of the medium. Microscopic examination of the culture showed that it was a pure culture of an acid-fast organism. Passages into glycerinated potatoes germinated well covering the surface of the same with a clear yellow granulated culture remaining the fluid (glycerinated water) quite limpid. The germination in glycerinated broth produced a yellow velum in the surface of the medium, as is seen in fig. 3 of Plate 2, without becoming turbid. The microorganism isolated twice from the same source of material was cocciforme (as *Mycobacterium pulviforme* of Marchoux), in the original culture, becoming more bacilliforme, allways acid-fast, after passage into glycerinated media.

The A. sent his culture to foreigner colleagues to study it and will inoculate it soon into laboratory animals.

Manguinhos, 4-3-1942.

ADENDO

ADENDO. — No dia 21/3/42 emulsionei uma cultura de 15 dias em meio de Loewenstein, da amostra "José", em 15 c.c. de soro fisiológico e inoculei-os em 15 animais, sendo 10 ratos e 5 cobaias (Lotes 34 e 35, respectivamente). Seis dias após morreu 1 cobaia, cuja autopsia nada revelou de importante.

A 6/4 (16 dias apos a inoculação) morreram 2 ratos e 2 cobaias, dos quais um de cada foi entregue ao meu laboratório em franca necrobiose por ter parado de funcionar a geladeira do bioterio na semana santa, segundo declarou-me o Sr. Avellar, encarregado do bioterio.

A autopsia do rato revelou: abcesso caseoso no peito, interessando a pele e o musculo peitoral direito ; abcesso no fígado e os pulmões transformados numa massa caseosa. Apesar deste pús ter-se revelado pobre (como é a regra) em bacilos a.a.r., semei-o, *in natura*, em 5 tubos de Loewenstein.

A cobaia autopsiada apresentava 2 abcessos caseosos no peritoneo, abaixo do estomago e outro na região inguinal direita, no ponto de inoculação. O pús desses abcessos foi positivo ao exame microscópico e foi semeado em 4 tubos de Loewenstein. Os esfregaços dos gânglios e vísceras foram negativos ao exame de rotina. Os orgãos desta cobaia e daquele rato foram enviados ao Dr. Magarinos Torres para exame anatomapatológico.

A 9/4 morreram outro rato e outra cobaia desses lotes 34 e 35. O 1.º apresentava nodulos caseosos no peritoneo e na axila direita, ponto de inoculação. As vísceras tinham aspecto normal. O abcesso da axila tendo por origem um gânglio, foi triturado, emulsionado e centrifugado. O seu sedimento revelou-se muito rico em bacilos a.a.r. e foi semeado em 5 tubos de Loewenstein. Os esfregaços do rim, gânglios e pús mostraram raros bacilos e os do fígado, baço e pulmões, foram negativos. A cobaia apresentava uma massa de pús caseoso, do tamanho dum grão de milho, na virilha direita e ao seu lado um enorme gânglio transformado em abcesso. Este gânglio foi triturado, emulsionado e centrifugado e o seu sedimento, tambem rico em bacilos, foi semeado em 5 tubos de Loewenstein. Os esfregaços dos pulmões e gânglios revelaram raros bacilos e os do figado e baço foram negativos ao exame rotineiro.

As lesões acima descritas, formadas entre 15 e 18 dias em ratos e cobaias, indicam que a cultura "José" é duma virulência muito superior ao comum dos bacilos a.a.r. isolados de material leproso e mesmo daqueles que foram depois classificados como sendo de Koch.

Retrocultura: — No dia 11 do corrente, portanto 5 dias após as semeaduras, verifiquei, ao retirar da estufa a 37º C., que 3 dos 4 tubos de Loewens-

tein semeados a 6/4 com pús de cobaia inoculada a 21/3 com a cultura "José", apresentavam espalhadas pela superficie do meio, multiplas pequeninas colonias amareladas, de tamanhos variaveis. A cor e o aspecto dessas colonias são idênticos ao da cultura inoculada.

Os 5 tubos de Loewenstein semeados tambem a 6/4 com pús de rato apresentavam-se contaminados e foram descartados.

Hoje sacrificarei um rato e uma cobaia dos ainda restantes para colher material fresco afim de confirmar esta retrocultura e fazer passagem noutros animais.

Manguinhos, 13 de abril de 1942.

Dr. Souza Araujo.

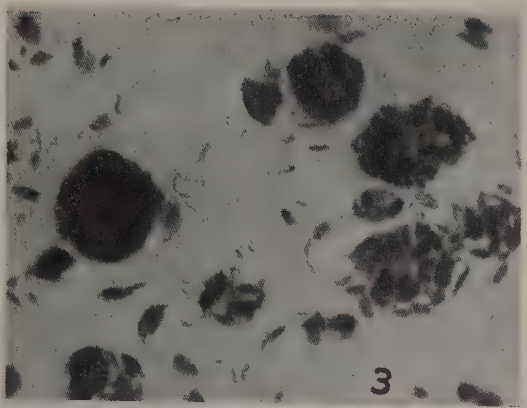
ESTAMPA 1

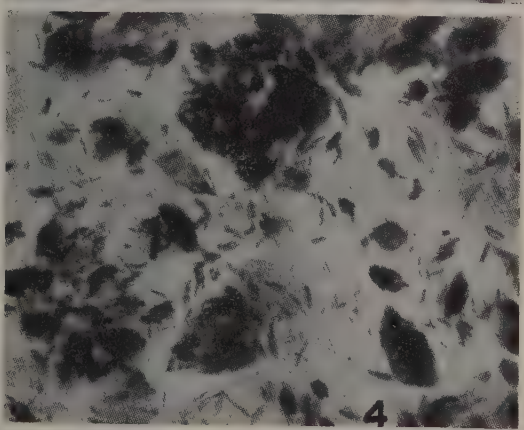
Fig. 1 — José, aos 7 ½ anos de idade, mostrando nos punhos e coxas alguns pontos negros, resto das pústulas descritas na observação clínica.

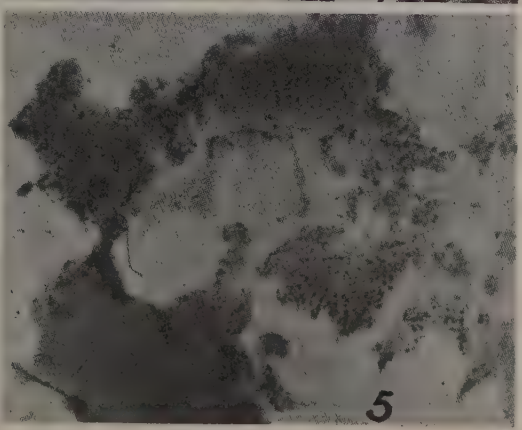
Fig. 2 — Culturas puras do pus semeado a 2/10 e 26/11/41 em meio de Loewenstein: ambas cromogênicas (amarelo cor de gema de ovo), granulosas, de aspecto seco e de dificil emulsionamento.

Fig. 3 e 4 — Globias e feixes de bacilos de Hansen em esfregaços do pus colhido em lesões fechadas, a 2/10/41.

Fig. 5 — Microfotografia do esfregaço da cultura original em Loewenstein: bacilos a.a.r. de aspecto granuloso, como o *Mycobacterium pulviforme* de Marchoux. Pela passagem em meios glicerinados passaram a predominar os elementos bacilares.







Fotos J. Pinto

Souza Araujo: Cultura cromogênica de lepra humana

ESTAMPA 2

Fig. 1 — Aspecto da cultura de 60 dias proveniente da 1.ª repicagem da cultura original de 26/11/41, em meio de Loewenstein.

Fig. 1A — Pequeno campo dum esfregaço delgado da cultura original em meio de Loewenstein.

Fig. 1AA — Outro campo mostrando os elementos cocciformes da cultura original em Loewenstein.

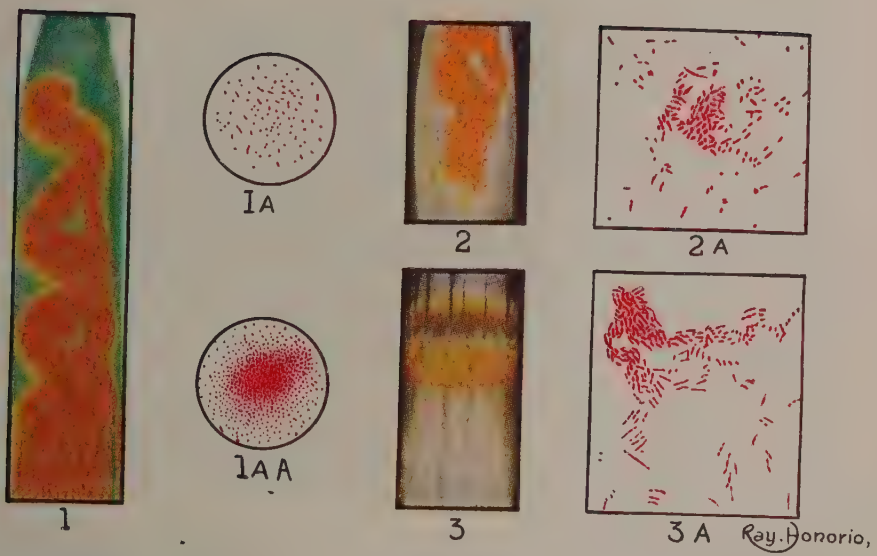
Fig. 2 — Cultura de 15 dias, 2.ª geração, em batata glicerinada, menos cromogênica que a original e semelhante às culturas de Duval, Currie e outros em igual meio. Líquido límpido.

Fig. 2A — Esfregaço da cultura em batata glicerinada, mostrando a predominância das formas bacilares.

Fig. 3 — Cultura de 15 dias, 2.ª geração, em caldo glicerinado. O líquido conserva-se límpido. O véu pregueado, amarelo, sobe um centímetro pela parede do tubo, e forma depósito no fundo.

Fig. 3A — Esfregaço do véu da cultura em caldo glicerinado, mostrando a predominância das formas bacilares.

MEM. INST. OSWALDO CRUZ
37 (1), MARÇO, 1942



Souza Araujo: Cultura cromogênica de lepra humana

A soro-aglutinação das Leishmanias *

pelo

Dr. A. M. da Cunha

(Chefe de serviço do I.O.C.)

Introdução — A existência da Leishmaniose viceral no Brasil, embora suspeitada, não havia, até 1934 sido demonstrada. Foi nessa data que apareceu o trabalho do Dr. H. PENA, revelando a existência de numerosos casos dessa doença no Norte e Nordeste do país. O trabalho desse autor baseava-se no encontro de parasitos desse gênero em fragmentos de fígado, colhidos por vicerotomia, para diagnóstico de febre amarela. Em vista disso, impunha-se o estudo detalhado da doença bem como do parasito que a produz. Esses estudos foram, em boa hora, empreendidos pelo Dr. EVANDRO CHAGAS, do Instituto Oswaldo Cruz, que seguiu nesse particular os conselhos de seu ilustre pai, o Prof. CARLOS CHAGAS. Coube-nos, nessa tarefa, o estudo do parasito sobre o qual já publicamos vários trabalhos, alguns em colaboração com aquele cientista.

No estudo do parasito, era, por certo, de grande importância a sua identificação a uma das espécies conhecidas ou a possivel criação de nova espécie, caso os caracteres apresentados não se enquadrassem em nenhuma delas.

Entre os métodos de laboratório propostos para a identificação das espécies desse gênero sobrelevam dois : a reação de soro-aglutinação instituida por NOGUCHI e o aspecto macroscópico das culturas em placa, segundo as pesquisas de MAYER e RAY. Nenhum desses métodos recebeu confirmação da unanimidade dos pesquisadores que deles se ocuparam e, porisso mesmo, era de interesse o seu estudo, com o fim de resolver o problema de seu valor diagnóstico e, no caso afirmativo, aplicá-los à identificação do agente do Kala-Azar americano.

No presente trabalho nos ocuparemos apenas da reação de soro-aglutinação, deixando para outra publicação o estudo dos aspectos das culturas em placa, segundo a técnica de MAYER e RAY, que tambem foi objeto de nossos estudos.

* Recebido para publicação a 5 de março e dado à publicidade em abril de 1942.

No decurso de nossa exposição, empregaremos para designar o agente do Kala-Azar americano a denominação de *Leishmania chagasi*. Assim procedendo, procuramos evitar o emprego frequente de longo circunlóquio para designar esse parasito, sem que isso represente uma mudança na opinião que expendemos em trabalho anterior, no qual consideramos o flagelado em questão como idêntico a *Leishmania infantum*. O termo *Leishmania chagasi* é pois aqui empregado com o fim meramente designativo da procedência das culturas empregadas.

Material e métodos de pesquisa

Material — Em nossos trabalhos sobre aglutinação de Leishmanias utilizamos 26 amostras pertencentes a todas as espécies admitidas. As amostras da *L. donovani, L. infantum* e *L. tropica* eram na sua quasi totalidade amostras isoladas há longo tempo e que nos foram enviadas do Velho Mundo por diversos Institutos científicos. Somente uma amostra de *L. donovani,* a amostra 45 de Adler, era recentemente isolada (10 meses antes de seu recebimento) e se mostrou ainda virulenta em nossas mãos, produzindo infecção de um Hamster.

Ao contrário, as amostras de *L. brasiliensis* e da *L. chagasi* eram quasi todas recentemente isoladas quando utilizadas em nossas experiências. Fazia exceção a essa regra, a *L. brasiliensis,* amostra Flavio, isolada há cerca de 10 anos quando iniciamos nossas experiências. A amostra J.A., embora recentemente isolada quando utilizada em 1937, foi empregada cerca de três anos mais tarde com o fim de estudar as alterações por acaso sofridas em sua constituição antigenica.

Damos a seguir a lista das amostras empregadas acompanhadas dos dados sobre sua procedência e data de isolamento.

Leishmania donovani

Mayer-Werner : Isolada em 1913 do sangue de um doente de Kala-Azar indiano no Inst. de Med. Tropical de Hamburgo. Recebida deste Instituto.

Sulimad : Isolada em 1924, de um doente de Kala-Azar indiano no Inst. de Med. Tropical de Hamburgo. Recebida deste Instituto.

Assimody : Isolada em 1925 de um doente de Kala-Azar indiano no Inst. de Med. Tropical de Hamburgo. Recebida deste Instituto.

China : Isolada na China por YOUNG. Recebida do Prof. NOGUCHI, do Instituto Rockfeller.

45 : Isolada em Novembro de 1936, de um doente de Kala-Azar indiano. Enviada pelo Prof. ADLER.

Leishmania infantum

Ka : Isolada por NICOLLE no Norte da África. Recebida do Inst. Bacteriológico de Buenos Ayres.

Prasek : Isolada em Zagreb pelo Prof. PRASEK, do sangue e do baço de um doente. Recebida do Inst. de Med. Tropical de Hamburgo.

Taschkent : Recebida do Inst. de Med. Tropical de Hamburgo para onde foi levada pelo Prof. SOFIEFF em 1931.

Leishmania tropica

Nöller : Isolada na Palestina pelo Dr. THEODOR. Recebida do Inst. de Med. Tropical de Hamburgo.

Iessner : Isolada em 1921 pelo Prof. IESSNER em Köenisberg de um doente do Turkestão, e recebida do Inst. de Med. Tropical de Hamburgo.

Moschkowsky : Isolada pelo Dr. MOSCHKOWSKY em Moscou, de um doente do Turkestão. Recebida do Inst. de Med. Tropical de Hamburgo.

Tunis : Isolada por NICOLLE, de um doente em Tunis. Recebida do Inst. de Med. Tropical de Hamburgo.

Jerichó : Isolada em Hamburgo de um doente infectado em Jerichó. Recebida do Inst. de Med. Tropical de Hamburgo.

Leishmania brasiliensis

Flavio : Isolada pelo Dr. FLAVIO DA FONSECA em 1927, em S. Paulo e por ele enviada.

Marilia : Isolada em 1935, de um doente na localidade de Marilia (Estado de S. Paulo).

J. A. : Isolada em 1937, em S. Paulo pelo Dr. L. SALLES GOMES e por ele enviada.

Baptista : Isolada em 1940, em S. Paulo, pelo Dr. BRUNO RANGEL PESTANA e por ele enviada.

Leishmania chagasi

Luis Ferreira : Isolada no Instituto Oswaldo Cruz em 1936, de um doente proveniente do Estado de Sergipe.

Florisvaldo : Isolada de um doente em 1937, no Estado do Pará.

Pantoja : Isolada de um doente em 1937, no Estado do Pará.

Teves : Isolada de um doente em 1937, no Chaco Argentino.

Isaias : Isolada de um doente em 1937, no Estado do Pará.

Cão 1 : Isolada de um cão naturalmente infectado, em 1937, no Estado do Pará.

Jolin : Isolada no Instituto Oswaldo Cruz em 1937, de um cão naturalmente infectado enviado do Estado do Pará.

Cão B : Isolada em 1938, de um cão experimentalmente infectado com as amostras Jolin e Magerona, esta última proveniente de cão naturalmente infectado no Estado do Pará.

Não te importes : Isolada de cão naturalmente infectado no Estado do Pará com passagens pelo Hamster.

As amostras provenientes do Estado do Pará foram isoladas pelo Dr. Evandro Chagas e seus auxiliares do Serviço de Grandes Endemias. A amostra *Teves*, proveniente do Chaco Argentino, foi isolada tambem pelo Dr. Evandro Chagas de um caso assinalado pelo Dr. C. Romaña.

Métodos de pesquisa — Duas técnicas diferentes se apresentavam na bibliografia para a execução das pesquisas que desejavamos efetuar. A primeira, proposta por Noguchi, consistia em cultivar as Leishmanias no meio por ele criado para Leptospiras, ao qual se havia juntado imune-soro, obtido em coelhos, em logar de soro normal ; o segundo consistia em executar as aglutinações com técnica semelhante à usada para as bactérias e que havia sido apresentada em sua forma mais perfeita no trabalho de Ray.

O primeiro método apresenta a *priori*, dois inconvenientes : o de reunir dois fenômenos com ótimos de temperatura diferentes e o de não se prestar a uma análise quantitativa. Algumas experiências executadas a princípio, vieram mostrar que esse método realmente não se prestava para chegar aos resultados que tinhamos em vista.

O método que adotamos em nossas pesquisas foi o de Ray, que consiste principalmente em utilizar, quer para a imunização dos coelhos destinados a fornecer os soros aglutinantes, quer para as suspensões de Leishmania a

serem usadas nas experiência de aglutinação, de flagelados cultivados em placas, segundo o método de MAYER e RAY.

Os soros aglutinantes eram preparados em coelhos, aos quais se injetavam, por via intra-venosa, suspensões espessas de flagelados, na dose de 1 a 2 cc com intervalo de cinco dias entre cada injeção. Geralmente quatro a cinco injeções eram suficientes para obter um soro aglutinante bastante forte, capaz de aglutinar geralmente a 1/20.000 chegando mesmo por vezes a 1/80.000. A sangria dos coelhos era praticada cerca de 10 dias após a última injeção.

Para a prática da aglutinação tomávamos uma série de tubos de hemolise e colocavamos em cada um deles 0,5 cc de água fisiológica com exeção do 1.º quando desejavamos partir de 1/200. Faziamos separadamente uma diluição de soro aglutinante a 1/100, colocavamos no primeiro tubo 0,5 cc dessa diluição, no segundo tubo juntavamos tambem 0,5 cc da diluição do soro, mistu rando bem com a água fisiológica nele contida, retirando depois 0,5 cc, que era acrescentado ao terceiro tubo e assim por diante. Obtinhamos assim a partir de 1/100, uma série de diluições crescentes do simples ao dobro. O último tubo era conservado com 0,5 cc de água fisiológica e servia como testemunha com o fim de excluir a existência da aglutinação expontânea como causa de erro. Faziamos a parte uma suspensão em água fisiológica de *Leishmanias* cultivadas em placa, suspensão essa que devia apresentar turvação semelhante à observada nas suspensões empregadas na aglutinação de bactérias. Sempre que tinhamos que utilizar em uma mesma experiência, diversas amostras de Leishmania e com o fim de obtermos resultados comparaveis entre si, procuravamos fazer as suspensões com igual grau de turvação. A cada um dos tubos, com as diluições de soro, juntavamos 0,5 cc da suspensão de *Leishmanias*, inclusive no tubo testemunha, que em seguida eram levados a estufa a 37º, procedendo-se a leitura cerca de duas horas depois.

E' óbvio que com a junção de 0,5 cc da suspensão de *Leishmanias* as diluições de soro contidas nos tubos ficaram duas vezes mais fortes.

As *Leishmanias* empregadas nas suspensões para aglutinação eram como já foi dito, provenientes de culturas em placa com cerca de oito dias após a semeadura. As culturas muito recentes tem o incoveniente de apresentarem às vezes o fenômeno de aglutinação expontânea, enquanto que as culturas mais velhas apresentam-se menos aglutinaveis e isso devido a existência de formas mortas, em via de desagregação.

A aglutinação expontânea ocorre muitas vezes nas culturas recentemente isoladas e isso se deu em nossas experiências principalmente com a *Leishmania brasiliensis* sem que possamos afirmar ser esse carater peculiar a essa

espécie. Alem disso, a aglutinação expontânea ocorre esporadicamente sem que se possa ligar o fenômeno a qualquer condição de cultura.

Os resultados obtidos com essa técnica são bastantes nítidos e apresentam-se nos primeiros tubos com a formação de flocos grossos, em pequeno número e com clarificação completa do líquido (++++); nos tubos seguintes, embora os flocos sejam ainda relativamente grossos, o líquido se apresenta ligeiramente turvo (+++); nos demais tubos observamos a presença de flocos mais finos (++) e por fim de flocos finíssimos (+).

Essa descrição corresponde ao aspecto macroscópico da reação. Excluimos em nossas experiências o exame microscópico, pois ele é desnecessário nos tubos em que a aglutinação é perfeitamente visivel a olho nú e impreciso nos tubos finais em que, de modo algum, serve para esclarecer os limites da aglutinação.

Conforme veremos ao tratar dos resultados obtidos, a simples reação de aglutinação não fornece resultados suficientemente nítidos, de maneira a permitir uma análise precisa do fenômeno que desejavamos esclarecer. Recorremos porisso a absorção de aglutininas já praticadas nas bactérias, constituindo o conhecido fenômeno de Castellani.

Para esse fim, nas primeiras experiências, fizemos uma espessa suspensão de Leishmanias cultivadas em placa, na própria diluição do soro em que pretendiamos praticar a absorção. Esse método apresentava o grave inconveniente de tornar o soro impediente e isso, provavelmente, devido a ação coloide-protetora de substâncias do meio de cultura contidas no líquido que impregnava os corpos dos flagelados.

Com o fim de evitar esse inconveniente, usamos, depois, lavar as *Leishmanias* uma ou duas vezes em água fisiológica antes de juntá-las à diluição do soro em que desejávamos praticar a absorção. Desse modo obtivemos resultados satisfatórios sem que se possa, porem, excluir de todo a ação impediente já referida.

Em todo o caso, quando não se observava aglutinação com nenhuma das amostras empregadas, com o fim de verificar se esse fato corria por conta da absorção total (*) das aglutininas ou da ação impediente do soro absorvido, tomavámos o primeiro tubo de cada uma das séries, isto é, os tubos em que o soro absorvido era contido em maior proporção, juntávamos a esses tubos 0,1 cc de diluições crescentes do soro aglutinante empregado para absorção mas em natureza e obtinhamos assim em cada tubo uma diluição cerca de

(*) A designação *absorção total* significa aqui que não houve aglutinação em nenhum dos tubos da prova com soro absorvido.

10 vezes maior que a acrescentada. Caso observássemos aglutinação nesses tubos, podíamos concluir que a ausência de aglutinação na primeira experiência era realmente causada pela absorção total das aglutininas e não pela ação impediente do soro absorvido.

Parte experimental — Ao iniciar nossas pesquisas, possuíamos uma única amostra de *L. chagasi,* a amostra *L.F.* e algumas amostras de *Leishmanias* de outras proveniências, de todas as espécies admitidas, a maioria delas, porem representada por uma única amostra.

Preparamos a princípio dois soros aglutinantes ; um, para a *L. donovani,* amostra *Assimody,* outro, para a *L. chagasi,* a amostra *L.F.*

Com cada um desses soros fizemos uma experiência de aglutinação empregando uma amostra de cada espécie conhecida e a amostra *L.F.* de *L. chagasi.* Essas experiências constam dos quadros 1 e 2 ; no primeiro, usamos o soro preparado com a *L. donovani* amostra *Assimody,* e no segundo, o soro preparado com a *L. chagasi,* amostra L.F.

QUADRO 1

AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS

Soro anti-donovani (Amostra Assimody) em natureza

AMOSTRA	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800	TEST
Assimody (*L. donovani*)	+++	+++	+++	++	++	+	—	—
Ka (*L. infantum*)	+++	+++	+++	++	—	—	—	
L. F. (*L. chagasi*)	+++	+++	++	+	—	—	—	—
Noller (*L. tropica*)	+++	+++	+++	++	+	+	—	—
Marilia (*L. brasil.*)	++	++	+	+	—	—	—	—

QUADRO 2

AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS

Soro anti-chagasi (Amostra L. F.) em natureza

AMOSTRA	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800	TEST.
L. F. (*L. chagasi*)	+++	+++	+++	+++	++	++	+	—
Assimody (*L. donovani*)	+++	+++	++	+	—	—	—	—
Ka (*L. infantum*)	+++	++	+	—	—	—	—	—
Noller(*L. tropica*)	+++	++	+	+	—	—	—	
Marilia (*L. brasil.*)	++	++	++	+	+	+	—	—

NOTA — Nestas aglutinações, executadas em 1936 +++ significa aglutinação máxima.

O exame do primeiro quadro mostra que todas as amostras empregadas foram aglutinadas, que os títulos de aglutinação apresentam diferenças pouco acentuadas e que a *L. tropica,* amostra *Nöller,* apresenta o mesmo título de aglutinação que a *L. donovani,* amostra *Assimody* que serviu para o preparo do soro. No segundo quadro, observa-se tambem aglutinação de todas as amostras empregadas, diferenças mais acentuadas nos títulos de aglutinação sendo que a amostra que mais se aproxima pelo título de aglutinação da amostra *L.F.* que serviu para o preparo do soro, é a *L. brasiliensis,* amostra *Marilia.* Nas duas experiências, observa-se que as *Leishmanias* que mais se aproximam pelo título de aglutinação pertencem a espécie admitidas por todos como diferentes, sendo nos dois casos uma visceral e outra tegumentar. Alem disso, as diferenças dos títulos observados, principalmente na primeira experiência, são pequenas para permitir uma segura separação das espécies.

Resolvemos, pois, recorrer as experiências de absorção de aglutininas, empregando a técnica já descrita no capítulo respectivo.

Nos primeiros ensaios, com o fim de formar uma idéia sobre a exequibilidade do método, empregamos sempre para comparação uma amostra visceral e outra tegumentar, isto é, amostras pertencentes a espécies admitidas por todos como distintas. Tanto nessas como em todas as outras experiências de absorção, faziamos ao lado do ensaio com soro absorvido, outro com o soro em natureza, com o fim de verificar a atividade do soro em relação às amostras empregadas.

Na primeira experiência desse gênero, cujo resultado consta dos quadros 3 e 4, empregamos o soro preparado com a *L. donovani,* amostra *Assimody,* usando para a aglutinação essa mesma amostra e a *L. tropica,* amostra *Iessner.*

No quadro 3, vemos o resultado obtido com o soro em natureza onde se pode observar que ambas as amostras são aglutinadas e que os títulos de aglutinação são bem pouco diferentes, confirmando os resultados obtidos anteriormente. No quadro 4, vemos o resultado da experiência executada com

QUADRO 3

AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS

Soro anti-donovani (Amostra Assimody) em natureza

AMOSTRA	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	TEST.
Assimody (*L. donovani*)	+++	+++	+++	+++	++	+	—	—
Iessner (*L. tropica*)	+++	+++	++	++	+	-	—	—

QUADRO 4

AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS

Soro anti-donovani (Amostra Assimody) absorvido pela L. trópica (Amostra Iessner)

AMOSTRA	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	TEST.
Assimody (*L. donovani*).....	+++	+++	++	++	+	-	—	—
Iessner (*L. tropica*).....	—	—	—	—	—	—	—	—

NOTA — Nestas aglutinações, executadas em 1936 + + + significa aglutinação máxima.

o mesmo soro, no qual se praticara a absorção de aglutininas pela *L. tropica*, amostra *Iessner*. Nesse quadro notaremos que a absorção de aglutininas foi completa em relação a essa amostra que não mais foi aglutinada, enquanto persistiam no mesmo soro aglutininas para a *L. donovani*, amostra *Assimody* que continuava a ser aglutinada e em título relativamente elevado.

Experiência semelhante foi feita com o mesmo soro, utilizando, porem, ao lado da *L. donovani*, amostra *Assimody*, a *L. brasiliensis*, amostra *Flavio*.

QUADRO 5

AGLUTINAÇAO DE LEISHMANIAS

25-11-1936

Soro anti-donovani (Amostra Assimody) em natureza

AMOSTRA	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	TEST.
Assimody (*L. donovani*).....	+++	+++	+++	+++	++	+	+	—
Flavio (*L. brasil.*).....	+++	+++	+++	++	+	+	—	—

QUADRO 6

AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS

26-11-1936

Soro anti-donovani (Amostra Assimody) absorvido pela L. brasiliensis (Amostra Flavio)

AMOSTRA	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	TEST.
Assimody (*L. donovani*).....	++	++	++	+	—	—	—	—
Flavio (*L. brasil.*).....	—	—	—	—	-	—	—	

NOTA — Nestas aglutinações, executadas em 1936 +++ significa aglutinação máxima.

Os resultados obtidos foram muito semelhantes aos das experiências anteriores,isto é, desaparecimento total das aglutininas para a *L. brasiliensis*, amostra *Flavio* que serviu para a absorção, presistência de aglutininas para a *L. donovani*, amostra *Assimody*.

Nessas experiências vemos que o soro preparado com uma amostra, absorvido por outra de espécie diferente, conserva as aglutininas para a primeira, embora a absorção tenha sido total em relação a amostra usada para esse fim.

Fizemos, então, uma experiência semelhante a essas, usando, porem, para comparação, alem da amostra que serviu para o preparo do soro, outra da mesma espécie.

O resultado dessa experiência consta dos quadros 7 e 8.

QUADRO 7

AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS

28 e 29-2-1937

Soro anti-donovani (Amostra Assimody) em natureza

AMOSTRA	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800	1/25600	1/51200	TEST.
Assimody (*L. donovani*....	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	—	—	—
Sulimad (*L. donovani*)....	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	—	—
Flavio (*L. brasil.*).....	++	++	++	++	+	—	—	+	—	—

QUADRO 8

AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS

28 e 29-2-1937

Soro anti-donovani (Amostra Assimody) absorvido pela L. brasiliensis (Amostra Flavio)

AMOSTRA	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800	1/25600	1/51200	TEST.
Assimody (*L. donovani*)....	++	++	++	+	+	—	—	—	—
Sulimad .*L. donovani*).....	++	++	++	+	—	—	—	—	—
Flavio (*L. brasiliensis*)	—	—	—	—	—	—	—	—	—

No segundo desses quadros vê-se que, apesar da absorção de aglutininas ser total em relação a espécie utilizada para esse fim, no caso a *L. brasiliensis*, amostra Flavio, persistiam, no soro absorvido, anticorpos capazes não só de

aglutinar a amostra que serviu para o preparo deste, a *L. donovani*, amostra *Assimody*, como para uma outra amostra da mesma espécie, a *L. donovani*, amostra *Sulimad*.

Embora não se pudessem tirar dessas experiências conclusões definitivas, deixaram elas antever a possibilidade de separar as espécies de *Leishmanias* por meio da soro-aglutinação.

Resolvemos então comparar a amostra *L.F.*, da *L. chagasi*, com a *L. donovani*, amostra *Assimody*. Para isso, absorvemos o soro preparado para esta última com a amostra *L.F.* fazendo, ao lado da prova com o soro absorvido, outra com o soro em natureza.

Os resultados dessa experiência que constam dos quadros 9 e 10 mostram, de um lado que, como já tínhamos observado anteriormente, a diferença dos títulos de aglutinação do soro em natureza para as duas amostras é insignificante, de outro que, no soro absorvido, desapareceram totalmente as aglutininas para a amostra *L.F.* empregada na absorção, enquanto persistiam às que atuavam sobre a amostra *Assimody*.

QUADRO 9

AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS

23 e 24-11-1936

Soro anti-donovani (Amostra Assimody) em natureza

AMOSTRA	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	TEST.
Assimody (*L. donovani*)	+++	+++	+++	++	+	+	—	—
L. F. (*L. chagasi*)	+++	+++	++	+	+	—		—

QUADRO 10

AGLUTINAÇAO DE LEISHMANIAS

23 e 24-11-1936

Soro anti-donovani (Amostra Assimody) absorvido pela L. chagasi (Amostra L. F.)

AMOSTRA	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	REST.
Assimody (*L. donovani*)	++	++	+++	+++	+	—	—	
L. F. (*L. chagasi*)	—			—	—		—	—

Outra experiência, feita com o soro preparado com a amostra *L.F.*, absorvido pela amostra *Assimody*, deu resultado semelhante, embora menos acentuado, como se pode observar nos quadros 11 e 12.

QUADRO 11

AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS

9-12-1936

Soro anti-chagasi (Amostra L. F.) em natureza

AMOSTRA	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	TEST.
L. F. (*L. chagasi*)	+++	+++	+++	+++	++	+	—	—
Assimody (*L. donovani*)	+++	+++	+++	++	+	—	—	—

QUADRO 12

AGLUTINAÇAO DE LEISHMANIAS

9-12-1936

Soro anti-chagasi (Amostra L. F.) absorvido pela L. donovani (Amostra Assimody)

AMOSTRA	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	TEST.
L. F. (*L. chagasi*)	++	++	+	—	—	—	—	—
Assimody (*L. donovani*)	—			—	—	—	—	—

Todas essas experiências foram efetuadas no ano de 1936.

Em 1937 iniciamos nova série de experiências, já então com novas amostras de *L. chagasi*, recentemente isoladas no norte do País. Nessa série empregamos as amostras *Florisvaldo*, *Pantoja* e *Cão 1*, as duas primeiras isoladas de casos humanos e a última de cão naturalmente infectado, comparando-as com as amostras *Assimody*, *Ka* e *Flavio*, pertencentes respectivamente às espécies *L. donovani*, *L. infantum* e *L. brasiliensis*. O soro empregado foi o preparado com a amostra *L.F.* e já utilizado em experiências anteriores. Infelizmente havíamos perdido essa amostra pelo que não figura ela nessas experiências.

Juntamente com as experiências de absorção, fizemos, como de praxe, a prova de aglutinação com o soro em natureza, sobre as seis amostras empregadas. O resultado que consta do quadro 13 mostra que os títulos de

aglutinação, embora apresentando diferenças pequenas, são sempre mais elevados nas amostras de *L. chagasi* do que nas outras.

QUADRO 13

28-4-1937

Soro anti-chagasi (Amostra L. F.) em natureza

AMOSTRA	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120	1/10240	TEST.
Florisvaldo (*L. chagasi*)	++++	++++	++++	++++	+++	+++	++	+	+	—	—
Pantoja (*L. chagasi*)	++++	++++	++++	++++	+++	+++	++	+	+	—	—
Cão 1 (*L. chagasi*)	+++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	++	+	+	—
Assimody (*L. donovani*)	+++	+++	+++	+++	++	+	+	—	—	—	—
Ka (*L. infantum*)	++++	++++	++++	++++	+++	++	++	+	—	—	—
Flavio (*L. brasil.*)	++++	++++	+++	+++	++	+	+	—	-	—	—

As provas de absorção desse soro com cada uma das três amostras acima referidas, deu sempre idênticos resultados, isto é, desaparecimento de aglutinação para a amostra empregada na absorção, persistência de aglutinação, embora em baixo título, para todas as amostras de *L. chagasi,* como se pode verificar nos quadros 14, 15 e 16.

Em continuação a essas experiências, já então de posse de novas amostras de outras espécies e tendo preparado soros aglutinantes para cada uma delas, fizemos outra série de experiências com o mesmo fim, isto é, comparar as diversas amostras de *L. chagasi* com cada uma das amostras de outras espécies.

QUADRO 14

AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS

22-4-1937

Soro anti-chagasi (Amostra L. F.) absorvido pela L. infantum (Amostra Ka)

AMOSTRA	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120	1/10240	TETS.
Ka (*L. infantum*)	—	-	—	—	—	—	—	—	—
Florisvaldo (*L. chagasi*)	+	+	+	+	—	—	—	-	—
Pantoja (*L. chagasi*)	+	+	+	+	—	—	—	—	—
Cão 1 (*L. chagasi*)	+	+	+	+	+	—	—	—	—

QUADRO 15

AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS

8-5-1937

Soro anti-chagasi (Amostra L. F.) absorvido pela L. donovani (Amostra Assimody)

AMOSTRA	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	TEST.
Assimody (*L. donovani*)	—	—	—	—	—	—	
Florisvaldo (*L. chagasi*)	+	+	—	—	—	—	—
Pantoja (*L. chagasi*)	+	+	—	—	—	—	—
Cão 1 (*L. chagasi*)	++	+	+	—	—	—	—

QUADRO 16

AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS

7-5-1937

Soro anti-chagasi (Amostra L. F.) absorvido pela L. brasiliensis (Amostra Flavio)

AMOSTRA	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/6400	1	TEST.
Flavio (*L. brasil*)	—	—	—	—	—	—	—
Florisvaldo (*L. chagasi*)	+	+		—	—	—	
Pantoja (*L. chagasi*)	+	+	—	—	—	—	—
Cão 1 (*L. chagasi*)	+	+	—	—	—		

QUADRO 17

AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS

22-6-1937

Soro anti-infantum (Amostra Ka) em natureza

AMOSTRA	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800	1/25600	1/51200	TEST.
Ka (*L. infantum*)	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	+	—	—
Prasek (*L. infantum*)	++++	++++	++++	+++	++	+	+	—	—	—
Taschkent (*L. infantum*)	++++	++	+	+	—	—	—	—	—	—
Florisvaldo (*L. chagasi*)	++++	++++	++++	++	+	—	—	—	—	—
Pantoja (*L. chagasi*)	+++	+++	+++	++	+	—	—	—	—	—
Cão 1 (*L. chagasi*)	++++	++++	++++	+++	++	—	—	—	—	—

QUADRO 18

AGLUTINAÇAO DE LEISHMANIAS

25-6-1937

Soro anti-infantum (Amostra Ka) absorvido pela L. chagasi (Amostra Florisvaldo)

AMOSTRA	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800	TEST
Florisvaldo (*L. chagasi*).....	—	—	—	—	—	—	—
Pantoja (*L. chagasi*).....	—	—	—	—	—	—	—
Cão 1 *L. chagasi*).....	—	—	—	—	—	—	—
Ka (*L. infantum*).....	++++	++++	+++	++	+	—	—
Prasek (*L. infantum*).....	++	++	+	+	—	—	—
Taschkent (*L. infantum*).....	++	+	+	—	—	—	—

As primeiras provas foram feitas com o soro *anti-infantum* preparado com a amostra *Ka*. Na experiência feita com o soro em natureza e cujo resultado consta do quadro 17, vemos que os títulos de aglutinação das amostras de *L. chagasi* são idênticos entre si e mais baixos que os da amostra *Ka*, que serviu para a preparação do soro, bem como dos da amostra *Prasek*, que dela pouco se afasta. Entretanto, uma amostra de *L. infantum*, a amostra *Taschkent*, apresenta título ainda mais baixo que o das amostras de *L. chagasi*.

QUADRO 19

AGLUTINAÇAO DE LEISHMANIAS

13-7-1937

Soro anti-donovani (Amostra China) em natureza

AMOSTRA	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800	1/25600	1/51200	1/10240	TEST.
China (*L. donovani*).....	++++	++++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	—	—
Assimody (*L. donovani*)..	++++	++++	+++	+++	++	+	—	—	—	—	—
Mayer - Werner (*L. donovani*).....	++++	++++	+++	+++	++	+	—	—	—	—	—
Prasek (*L. infantum*)....	++++	++++	+++	+++	++	+	+	—	—	—	—
Florisvaldo (*L. chagasi*)..	++++	+++	++	+	—	—	—	—	—	—	—
Pantoja (*L. chagasi*).....	++++	++++	+++	++	+	—	—	—	—	—	—
Teves (*L. chagasi*)	++++	+++	++	+	—	—	—	—	—	—	—
Cão 1 (*L. chagasi*)	++++	+++	+	+	—	—	—	—	—	—	—

QUADRO 20

AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS

14-7-1937

Soro anti-donovani (Amostra China) absorvido pela L. chagasi (Amostra Florisvaldo)

AMOSTRA	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800	TEST.
Florivaldo (*L. chagasi*)	—	—	—	—	—	—	—
Pantoja (*L. chagasi*)	—	—	—	—	—	—	—
Teves (*L. chagasi*)	—	—	—	—	—	—	—
Cão 1 (*L. chagasi*)	—	—	—	—	—	—	—
China (*L. donovani*)	+++	++++	+++	+++	++	+	—
Assimody (*L. donovani*)	+++	+++	+	—	—	—	—
Mayer (*L. donovani*)	+++	++	+++	++	++	+	—
Prasek (*L. infantum*)	+++	++	++	+	+	—	—

Na prova de absorção, que foi feita com a amostra *Florisvaldo*, pudemos verificar o desaparecimento total de aglutininas, não só para essa amostra como para as demais da mesma espécie. Ao contrário, persistiam anticorpos capazes de aglutinar todas as amostras de *L. infantum* empregadas, mesmo em títulos bastante elevados. Experiência semelhante foi feita com um soro *anti-donovani* preparado com a amostra *China*. Nessa experiência, empregamos alem de diversas amostras de *L. donovani* a amostra *Prasek*, de *L. infantum*, bem como uma nova amostra de *L. chagasi*, a amostra *Teves*, isolada na Argentina.

Os resultados que constam dos quadros 19 e 20 são semelhantes aos da experiência anterior.

QUADRO 21

AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS

27-7-1937

Soro anti-brasiliensis (Amostra Flavio) em natureza

AMOSTRA	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800	1/25600	1/51200	1/102400	TEST.
Flavio (*L. brasil.*)	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	++	+	—	—
Florisvaldo (*L. chagasi*)	++++	+++	++	+	—	—	—	—	—	—	—
Teves (*L. chagasi*)	++++	+++	++	++	+	—	—	—	—	—	—
Cão 1 (*L. chagasi*)	++++	+++	++	+	—	—	—	—	—	—	—

QUADRO 22

AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS

27-7-1937

Soro anti-brasiliensis (Amostra Flavio) absorvido pela L. chagasi (Amostra Florisvaldo)

AMOSTRA	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800	TEST.
Florivaldo (*L. chagasi*)	—	—	—	—	—	—	—
Cão 1 (*L. chagasi*)	—	—	—	—	—	—	—
Teves (*L. chagasi*)	—	—	—	—	—	—	—
Flavio (*L. brasil.*)	+++	++++	++++	++++	++++	++++	—

QUADRO 23

AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS

5-8-1937

Soro anti-tropica (Amostra Iessner) em natureza

AMOSTRA	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800	1/25600	1/51200	TEST.
Noller (*L. tropica*)	++++	+++	++	+	+	·	—	·	—	—
Florisvaldo (*L. chagasi*)	++++	+++	+	—	—	—	—	—	—	—
Teves (*L. chagasi*)	+++	++	+	—	—	—	—	·	—	·
Cão 1 (*L. chagasi*)	+++	++	+	—	—	·	—	—	—	—
Mosch (*L. tropica*)	+++	++++	+++	+++	++	+	—	—	—	—

QUADRO 24

AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS

5-8-1937

Soro anti-tropica (Amostra Iessner) absorvido pela L. chagasi (amostra Florisvaldo,)

AMOSTRA	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800	TEST.
Florisvaldo (*L. chagasi*)	—	—	—	—	—	—	—
Teves (*L. chagasi*)	—	—	—	—	—	—	—
Cão 1 (*L. chagasi*)	—	—	—	—	—	—	—
Noller (*L. tropica*)	++	++	+	+	—	—	—
Moschkowski (*L. tropica*)	+++	+++	++	++	+	+	—

700.272 — F. 10

Experiências semelhantes foram efetuadas com soros preparados com as amostras *Flavio* da *L. brasiliensis* e *Iessner* da *L. tropica*, com idênticos resultados, quadros 21 a 24.

Essas experiências mostram que a *L. chagasi* se comporta, em relação a soro aglutinação, de maneira diferente das amostras de outras espécies e que todas as amostras de *L. chagasi* se comportam de maneira idêntica.

Restava comparar as diversas amostras de *L. chagasi* entre si. Para isso, fizemos as provas que constam dos quadros 25 a 28.

QUADRO 25

AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS

24-4-1937

Soro anti-chagasi (Amostra L. F.) em natureza

AMOSTRA	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120	1/10240	TEST
Florisvaldo (*L. chagasi*)	++++	++++	++++	++++	+++	+++	++	+	+	—	—
Pantoja (*L. chagasi*)	++++	++++	++++	++++	+++	+++	++	+	+	—	—
Cão 1 (*L. chagasi*)	+++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	++	+	+	—

QUADRO 26

AGLUTINAÇAO DE LEISHMANIAS

7-5-1937

Soro anti-chagasi (Amostra L. F.) absorvido pela L. chagasi (amostra Florisvaldo)

AMOSTRA	1/200	1/400	1/80	1/1600	1/3200	1/6400	1 TEST.
Florisvaldo *L. chagasi*	—	—	—	—			—
Pantoja *L. chagasi*	—	—	—	—		—	
Cão 1 (*L. chagasi*)	—	—	—	—	—	—	—

Nas duas primeiras utilizamos o soro preparado com a amostra L.F. em natureza e absorvido pela amostra *Florisvaldo*. O soro em natureza (quadro 25) aglutinou todas as amostras em título sensivelmente idêntico, enquanto que o soro absorvido (quadro 26) não mais aglutinou nenhuma das amostras empregadas. Nas duas outras experiências lançamos mão do soro preparado com a amostra *Florisvaldo*, em natureza e absorvido pela amostra *Cão 1* e os resultados obtidos foram idênticos aos das experiências precedentes.

QUADRO 27

AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS

17-8-1937

Soro anti-chagasi (Amostra Florisvaldo) em natureza

AMOSTRA	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800	1/25600	1/51200	1/102400	TES.
Florisvaldo (*L. chagasi*)	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	+	—	—	—
Teves (*L. chagasi*)	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	+	—	—	—
Cão 1 (*L. chagasi*)	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	—	—	—	—
Pantoja (*L. chagasi*)	++++	++++	+++	+++	+++	+++	++	—	—	—	—

QUADRO 28

17-8-1937

Soro anti-chagasi (Amostra Florisváldo) absorvido pela L. chagasi (Amostra Cão 1)

AMOSTRA	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800	TEST.
Florivaldo (*L. chagasi*)	—	—	—	—	—	—	—
Teves (*L. chagasi*)	—	—	—	—	—	—	—
Cão 1 (*L. chagasi*)	—	—	—	—	—	—	—
Pantoja (*L. chagasi*)			—			—	—

Examinando em conjunto os resultados obtidos até então, vemos que todas as amostras empregadas de *L. chagasi* se separavam pela soro-aglutinação das de outras espécies, ao passo que apresentavam, entre si, idêntica constituição antigênica, qualquer que fosse o local de sua proveniência, Norte do Brasil ou Argentina, qualquer que fosse o animal de que tivesse sido isolada, homem ou cão.

Resolvemos então fazer nova série de experiências comparando as diversas espécies conhecidas entre si. Essas experiências deram resultados inesperados e contraditórios. Assim, de um lado, amostras de espécies diferentes apresentavam as vezes constituições antigênicas idênticas ou muito próximas para permitir sua separação ; por outro lado, amostras da mesma espécie mostravam constituições antigênicas bastante diferentes entre si. Como exemplo citaremos algumas de nossas experiências. Nos quadros 29 a 32 vemos

os resultados obtidos com as amostras *Assimody* e *Ka*, pertencentes, respectivamente, às *Leishmanias donovani* e *infantum*.

QUADRO 29

AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS

10-4-1937

Soro anti-donovani (Amostra Assimody) em natureza

AMOSTRA	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800	1/25600	1/51200	TEST.
Assimody (*L. donovani*)	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	—	—	—
Ka (*L. infantum*)	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	—	—	—

QUADRO 30

AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS

10-4-1937

Soro ánti-donovani (Amostra Assimody) absorvido pela L. infantum (Amostra Ka)

AMSOTRA	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800	1/25600	1/51200	TEST.
Assimody (*L. donovani*)	+	+	+	+	—	—	—	—	—
Ka (*L. infantum*)	+	+	+	—	—	—	—	—	—

QUADRO 31

AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS

9-4-1937

Soro anti-infantum (Amostra Ka) em natureza

AMOSTRA	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800	1/25600	1/51200	TEST.
Ka (*L. infantum*)	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	—	—
Assimody (*L. donovani*)	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	—	—

QUADRO 32

AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS

9-4-1937

Soro anti-infantum (Amostra Ka) absorvido pela L. donovani (Amostra Assimody)

AMOSTRA	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800	1/25600	1/51200	TEST
Ka (*L. infantum*).....	++	++	+	+	—	—	—	—	—
Assimody (*L. donovani*).....	+	+	+	—	—	—	—	—	—

Nos dois primeiros quadros (29 e 30) empregamos o soro preparado com a amostra *Assimody* em natureza e absorvida pela amostra *Ka*. Os títulos de aglutinação do soro em natureza para as duas espécies é o mesmo, no soro absorvido, embora não houvesse absorção total das aglutininas, pois ambas foram ainda aglutinadas; a diferença observada entre os títulos de aglutinação das duas espécies é muito pequena para ser significativa. Duas outras experiências foram feitas com o soro preparado com a amostra *Ka* com idêntico resultado. Outras provas foram efetuadas empregando o soro preparado com a *L. brasiliensis*, amostra *Flavio*, comparando essa espécie com duas amostras de *L. tropica*, *Tunis* e *Iessner*.

Na primeira experiência (quadro 33) feita com o soro em natureza, vemos que as amostras Flavio de *L. brasiliensis* e *Tunis* de *L. tropica* são aglutinadas a títulos sensivelmente idênticos, enquanto que a amostra *Iessner* pertencente tambem à *L. tropica*, era aglutinada em título muito mais baixo. A absorção do soro por essa última amostra, embora não esgotasse de todo as aglutininas para ela, deixa ver uma queda muito grande no título de aglutinação dessa

QUADRO 33

AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS

10-2-1937

Soro anti-brasiliensis (Amostra Flavio) em natureza

AMOSTRA	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800	1/25600	1/51200	1/102400	TEST.
Flavio (*L. brasil.*).....	++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	—	—	—
Tunis (*L. tropical*.....	++	++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	—	—
Iessner (*L. tropica*),.....	+++	+++	++	++	++	+	—	—	—	—	—

QUADRO 34

AGLUTINAÇAO DE LEISHMANIAS

10-2-1937

Soro anti-brasiliensis (Amostra Flavio) absorvida pela L. tropica (Amostra Iessner)

AMOSTRA	1/200	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800	1/25600	TES.
Flavio (*L. brasil.*)	+++	+++	+++	+++	++	+	—	—
Tunis (*L. tropica*)	+++	+++	+++	+++	++	+	—	—
Iessner (*L. tropica*)	+	+	+	—	—	—	—	—

QUADRO 35

AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS

11-2-1937

Soro anti-brasiliensis (Amostra Flavio) absorvido pela L. tropica (Amostra Tunis)

AMOSTRA	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/1280	1/25600	TEST
Flavio (*L. brasil.*)	—	—	—	—	—	—	—	—
Tunis (*L. tropica*)	—	—	—	—	—	—	—	—
Iessner (*L. tropica*)	—	—	—	—	—	—	—	—

amostra, enquanto as outras duas sofreram queda muito menor e na mesma proporção em ambos, quadro 34.

Dessas experiências se pode concluir que a *L. tropica*, amostra *Tunis*, apresenta uma constituição antigênica muito mais próxima da amostra *Flavio*, da *L. brasiliensis*, do que a amostra *Iessner*, pertencente à mesma espécie. Para confirmar esse resultado, fizemos a absorção do mesmo soro pela amostra *Tunis* e pudemos então verificar o desaparecimento total das aglutininas para as três amostras em questão, o que prova ter a amostra *Tunis* da *L. tropica* a mesma constituição antigênica que amostra *Flavio* da *L. brasiliensis*. Por essas experiências vemos que uma amostra de *L. tropica*, a amostra *Tunis*, apresenta constituição antigênica diferente de outra da mesma espécie, a amostra *Iessner* e idêntica a da amostra *Flavio* de espécie diferente.

Muitas outras experiências foram executadas com idênticos resultados, isto é, amostras de uma mesma espécie, apresentavam quase sempre constitui-

ção antigênica diferente, enquanto que, quando duas amostras, apresentavam constituição antigênica idêntica ou muito próxima pertenciam geralmente a espécies diferentes.

Comparando esses resultados com os anteriormente obtidos em que todas as amostras de uma mesma espécie (*L. chagasi*) mostraram idêntica constituição antigênica, procuramos qual a diferença entre essas amostras e as demais com que trabalhamos, a que pudéssemos atribuir essa diversidade de comportamento. Ora, a única particularidade que encontramos foi que todas as amostras de *L. chagasi* utilizadas eram *recentemente isoladas*, ao passo que todas as amostras das outras espécies *haviam sido isoladas há muito tempo* e conservadas em cultura desde então. Poder-se-ia pois, admitir que a permanência em cultura por longo prazo tivesse alterado a constituição antigênica primitiva dessas amostras, com formação de antigenos secundários, responsaveis pela diversidade dos resultados obtidos.

Resolvemos, então, em novas experiências, utilizar somente amostras recentemente isoladas das diversas espécies, comparando-as entre si. Esse nosso propósito, porem, esbarrou em grande dificuldade pois, se de um lado possuiamos numerosas amostras recentemente isoladas de *L. chagasi*, por outro era dificil obter amostras nas mesmas condições das demais espécies, principalmente daquelas que teriam de ser enviadas do Velho Mundo.

Recebida a primeira amostra nessas condições, a amostra *J.A.* de *L. brasiliensis*, fizemos a experiência que consta dos quadros 36 e 37. Nessas experiências, utilizamos o soro preparado com a *L. chagasi*, amostra *Floris-*

QUADRO 36

AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS

22-10-1937

Soro anti-chagasi (Amostra Florisvaldo) em natureza

AMOSTRA	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800	1/25600	1/51200	1/102400	TEST.
Florisvaldo (*L. chagasi*).	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	+	—	—	—
Teves (*L. chagasi*)	++++	++++	++++	++++	+++	++	+	—	—	—	—
Cão 1 (*L. chagasi*)	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	—	—	—
J. A. (*L. brasil.*)	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	+	+	—	—

NOTA — A aglutinação coma amostra Cão 1, foi feita em 10-11-1937.

QUADRO 37

AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS

29-10-1937

Soro anti-chagasi (Amostra Florisvaldo) absorvido pela L. brasiliensis (Amostra J. A.)

AMOSTRA	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800	TEST.
J. A. (*L. brasiliensis*)	—	—	—	—	—	—	—
Florisvaldo (*L. chagasi*)	—	—	—	—	—	—	—
Teves (*L. chagasi*)	—	—	—	—	—	—	—
Cão 1 (*L. chagasi*)	—	—	—	—	—	—	—

valdo, em natureza e absorvido pela amostra *J.A.* da *L. brasiliensis*, empregando para aglutinação, alem da amostra usada na absorção, três amostras de *L. chagasi* inclusive aquela que serviu para preparo do soro.

Na experiência feita com o soro em natureza, o título de aglutinação foi, por assim dizer, idêntico em todas as amostras, na prova executada com o soro absorvido, nenhuma delas foi aglutinada, deixando ver claramente que todas elas possuem idêntica constituição antigênica. A contra-prova feita, segundo a técnica descrita anteriormente, mostrou, de maneira nítida, que o resultado observado não corria por conta de qualquer ação impediente do soro adsorvido, pois mesmo em baixa concentração (1/3200), o soro acrescentado se mostrou capaz de aglutinar com bastante intensidade na presença da dose máxima de soro absorvido utilizada.

QUADRO 38

AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS

10-11-1937

Soro anti-chagasi (Amostra Florisvaldo) em natureza

AMOSTRA	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800	1/25600	1/51200	1/102400	TEST.
Amostra 45 (*L. donovani*)	++++	++++	++++	++++	++	++	+	.	—		
Pantoja (*L. chagasi*)	++++	++++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	—	—
Joly (*L. chagasi*)	++++	++++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	—	—
J. A. (*L. brasil.*)	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	+	+	—	—

NOTA — A aglutinação com a amostra *L. brasiliensis* (J. A.) foi feita em 22-10-37.

Outra experiência desse gênero foi efetuada empregando a amostra *45* de ADLER, isolada cerca de 10 meses antes de um caso de Kala-Azar indiano. Nessa prova, o soro utilizado foi ainda o preparado com a amostra *Florisvaldo* de *L. chagasi* empregando para absorção a amostra *45* acima referida.

QUADRO 39

AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS

15-12-1937

Soro anti-chagasi (Amostra Florisvaldo) absorvido pela L. donovani (Amostra 45)

AMOSTRA	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800	TEST.
Amostra 45 (*L. donovani*).....	+	+	—	—	—	—	—
J. A. (*L. brasiliensis*).....	+	—	—	—	—	—	—
Pantoja (*L. chagasi*).....	+	—	—	—	—	—	—
Joly (*L. chagasi*).....	+	—	—	—	—	—	—

Nessa experiência cujo resultado consta dos quadros 38 e 39, não houve absorção total das aglutininas pois a aglutinação era ainda observada em todas as amostras no primeiro tubo da prova, isto é, na diluição de 1/400 sendo que, a amostra *45* que serviu para absorção se mostrou mesmo aglutinada no título de 1/800. Esse fato não diminue de forma alguma o valor da experiência, pois foi a amostra que serviu para absorção a que se mostrou mais aglutinada e isso provavelmente devido a maior aglutinibilidade na ocasião da cultura empregada. No caso contrário, se fossem as outras amostras as aglutinadas a título mais alto, poder-se-ia suspeitar de qualquer divergência na constituição antigênica, embora a diferença de título observada não fosse significativa.

QUADRO 40

AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS

14-12-1937

Soro anti-donovani (Amostra 45)

AMOSTRA	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800	1/25600	1/51200	1/102400	TEST.
Amostra 45 (*L. donovani*).....	++++	+++	+++	+++	+++	++	+	—	—	—	—
J. A. (*L. brasil.*).....	++++	++++	++++	+++	++	++	+	—	—	—	—

Esses resultados provam que tanto a amostra *J.A.* da *L. brasiliensis*, como a amostra *45* de *L. donovani* possuem a mesma constituição antigênica da amostra *Florisvaldo* de *L. Chagasi*, bem como das outras da mesma espécie com que foram comparadas, e são, portanto, idênticas entre si sob esse ponto de vista.

Duas outras experiências corroboram esse resultado, conforme se verifica nos quadros 40 e 41.

QUADRO 41

Soro anti-brasiliensis (Amostra J. A.)

AMOSTRA	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800	1/25600	1/51200	1/102400	TEST.
J. A. (*L. brasil.*)	++++	+++	+++	+++	++	+	—	—	—	—	—
Amostra 45 (*L. donovani*).....	++++	++++	+++	++	+	+	—	—	—	—	—

No primeiro, um soro preparado com amostra *J.A.* aglutinou a igual título essa amostra e a amostra *45* de *L. donovani;* no segundo, o mesmo fato ocorre com um soro preparado com essa última amostra atuando sobre ela e a amostra *J.A.* já referida. Vemos assim que amostras recentemente isoladas, pertencentes a três espécies diferentes, mostraram idêntico constituição antigênica entre si. As três espécies utilizadas, por feliz coincidência, são uma tegumentar e as duas outras viscerais, sendo que essas divergem não só pelas características zoogeográficas como pela forma da doença que produzem.

Examinando os fatos relatados, podemos concluir que todas as Leishmanias, qualquer que seja a espécie a que pertençam e o tempo por que foram conservadas em cultura, apresenta um *antígeno comum,* o que faz com que o soro preparado com uma amostra aglutine sempre todas as demais, embora à títulos diferentes.

Vemos tambem que as amostras recentemente isoladas possuem idêntica constituição antigênica, muito embora pertençam a espécies admitidas por todos como distintas.

Por outro lado as amostras conservadas por longo tempo em cultura sofrem modificações em sua constituição antigênica, modificações essas que independem das espécies a que pertencem.

As experiências, contudo, foram continuadas, não só para trazerem mais ampla documentação aos fatos observados, como para esclarecer alguns pontos que, a nosso ver, não haviam ficado convenientemente estabelecidos.

Evidentemente, seria de grande interesse verificar se amostras recentemente isoladas de outras espécies, tais como a *L. infantum* e *L. tropica*, apresentavam tambem constituição antigênica idêntica às demais, embora tudo leve a crer que isso se dê. Infelizmente, porem, não nos foi possivel obter amostras recentes dessas espécies.

Outro ponto a esclarecer, era a causa da permanência de aglutininas nos soros preparados com amostras recentes, quando absorvidas por amostras antigas.

Para explicar esse fato, fomos levados a admitir a existência nas amostras recentes, de um antígeno especial, peculiar a essas amostras, e que desapareceria com a cultura da mesma por longo tempo. Como a presença desse antigeno e a virulência são propriedades que coexistem nessas amostras, julgamos poder assemelhar o antígeno em questão ao encontrado nas bactérias em idênticas condições e denominado antigeno *vi*.

Se examinarmos, porem, atentamente os quadros ns. 14, 15 e 16, em que um soro preparado com amostra recente foi absorvido por amostras antigas, veremos que as aglutininas que persistem após a absorção, são em pequena quantidade e capazes de aglutinar as amostras recentes somente a baixo título. Esse fato se torna particularmente nítido quando comparamos esses quadros com os de ns. 18, 20, 22 e 24, em que soros preparados com amostras antigas eram absorvidos por amostras recentes.

Essa diferença de comportamento poderia ser atribuida ao título relativamente baixo do soro empregado nas primeiras experiências em contraposição aos soros de títulos muito mais elevados, utilizados nessas últimas.

QUADRO 42

AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS

15-7-1938

Soro anti-chagasi (Amostra Florisvaldo) em natureza

AMOSTRA	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800	1/25600	1/51200	1/102400	TEST
Jerichó (*L. tropica*).....	++	+++	+++	+++	++	+	—	—	—	—	—
Assimody (*L. danovani*)...	++++	++++	++++	+++	++	+	—	—	—	—	—
Florisvaldo (*L. chagasi*)	+++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	+	+	—
Cão B. (*L. chagasi*).....	++++	++++	+++	+++	++	+	—	—	—	—	—
J. A. (*L. brasil*).....	++++	++++	++++	++++	+++	+++	++	+	+	—	—

QUADRO 43

AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS

22-7-1938

Soro anti-chagasi (Amostra Florisvaldo) absorvido pela L. donovani (Amostra Assimody)

AMOSTRA	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800	TEST.
Assimody (*L. donovani*).....	—	—	—	—	—	—	—
Jerichó (*L. tropica*).....	—	—	—	—	—	—	—
Cão B, (*L. chagasi*).....	+	+	—	—	—	—	—
Isaias *L. chagasi*).....	+	—	—	—	—	—	—
Florisvaldo (*visc. L. chagasi*)...	+	—	—	—	—	—	—

Fomos assim levados a fazer novas experiências utilizando soro preparado com amostra recente de título mais elevado.

Essa experiência não deu, porem, o resultado esperado, pois as aglutininas persistentes após a absorção não eram em maior quantidade que as observadas na experiências anteriores, conforme se pode verificar no quadro n. 43. Essa verificação está em desacordo com a hipótese da existência de um antígeno *vi*, peculiar às amostras recentes, pois com o aumento do título de aglutinação do soro deveria tambem crescer a quantidade de anticorpos correspondentes a esse antígeno, acarrentando assim, uma elevação no título de aglutinação do soro absorvido.

Pensamos, então, que o fenômeno em questão poderia correr por conta, não da existência de um antígeno peculiar às amostras recentemente isoladas, mas de diferenças nas quantidades nelas contidas de *antígeno comum*, que seria mais abundante nas amostras recentes que nas antigas. Realmente, sabemos que para que haja aglutinação é necessário que exista certa relação quantitativa entre o antígeno e o anti-corpo correspondente. Ora, se as amostras recentes contivessem maior quantidade de antígeno comum que as antigas, pequenas quantidades de aglutininas persistentes no soro absorvido poderiam ser capazes de ainda aglutinar essas amostras e se mostrarem inativas diante das amostras antigas, devido a não conterem essas quantidade de aglutinogeneo suficiente para a realização do fenômeno. Se essa hipótese correspondesse à realidade, aumentando a quantidade de *Leishmanias* empregadas na absorção, deveríamos chegar a um ponto em que a quantidade de aglutininas persistentes após a absorção, seria tambem incapaz de aglutinar as amostras recentes. Esse fato não poude, porem, ser confirmado na prática, pois com o

aumento da quantidade de flagelados empregados na absorção, cresce o poder impediente do soro absorvido, sem que se possa, de modo algum, obviar a esse inconveniente, de maneira que, toda vez que o soro se mostrava de todo inativo, o poder impediente deste era tão grande que poderia por si só explicar o fenômeno.

Embora as experiências a que nos referimos não permitissem chegar aos resultados desejados, constituem elas um argumento em favor da maior riqueza em antígeno comum das amostras recentes. Assim, vemos que com quantidades relativamente pequenas de Leishmanias recentemente isoladas, podemos, por absorção, obter a inativação de um soro, no qual, após a absorção, o poder impediente é por assim dizer inexistente, como se pode verificar na experiência complementar do quadro n. 37; com as amostras antigas isso não é possivel devido à grande massa de flagelados exigida para a absorção, o que acarreta o aparecimento da ação impediente já referida.

Com o fim de demonstrar essa hipótese, instituimos experiências em que procuramos avaliar a quantidade de antígeno comum contido em diversas amostras pela capacidade de absorção de aglutininas em relação a um soro determinado, sendo que, para aquilatarmos da maior ou menor absorção de aglutininas, dosavamos o poder aglutinante do soro absorvido, sendo óbvio que, quanto mais baixo fosse o título do soro em questão maior seria a absorção verificada.

Para isso, tomamos um soro preparado com amostra recente, que em nossas experiências foi o soro obtido com a amostra *Florisvaldo,* e juntamos, a determinadas quantidades desse soro, quantidades iguais em peso, de um lado, de uma amostra recente, de outro de uma amostra antiga.

Na prática, tivemos que modificar essa técnica, pela dificuldade em obter pesos idênticos de Leishmanias, juntando a quantidades de Leishmanias, previamente pesadas, quantidades de soro proporcionais a esse peso o que, evidentemente, não altera o resultado final.

A primeira experiência foi feita com as amostras *Cão B* (recente) e *Assimody* (antiga) e dela damos a seguir, em protocolo, descrição detalhada:

"Tomamos dois tubos numerados, respectivamente, 1 e 2, e pesamos.

1.ª pesagem { Tubo 1 — 7,290 g.
Tubo 2 — 7,228 g.

Colocamos em cada um deles uma suspensão de *Leishmanias,* sendo no tubo 1 da amostra *Cão B* (*L. chagasi,* recentemente isolada) e no tubo 2 da amostra *Assimody* (*L. donovani,* antiga). Centrifugamos, retiramos o líquido, pesando de novo os tubos.

2.ª pesagem { Tubo 1 — 7,389 g.
Tubo 2 — 7,362 g.

Tomando a diferença entre as segunda e primeira pesadas encontramos :

Tubo 1, 0,099 g. e tubo 2, 0,134 g., que representam o peso da massa de *Leishmanias* contidas em cada tubo.

Juntamos a cada tubo quantidades de uma diluição de soro anti-*Florisvaldo* a 1%, na proporção de 0,02 cc. por miligramo de peso, isto é, 1,98 cc., no tubo 1, e 2,68 cc., no tubo 2. Deixamos duas horas na estufa a 37° para absorção das aglutininas, centrifugando depois para separar a diluição de soro dos corpos de *Leishmanias* que serviram para a absorção.

Com cada um dos soros assim absorvidos e com o mesmo soro em natureza, cuja diluição havia tambem permanecido duas horas na estufa a 37°, foram feitas, com suspensão da amostra *Cão B*, provas de aglutinação, cujo resultado se pode observar no quadro n. 44".

QUADRO 44

AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS

28-7-1938

Aglutinação com a amostra Cão B

Soro anti-chagasi (Amostra Florisvaldo)

DILUIÇÕES	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800	1/25600	1/51200	1/102400	TEST
Soro em natureza.....	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	+	—	—
Soro Florisvaldo, absorvido com Cão B.....	+++	++	+	+	—	—	—	—	—	—
Soro Florisvaldo, absorvido com Assimody....	++++	++++	+++	+++	++	+	—	—	—	—

Vemos por essa experiência que a amostra recentemente isolada tem maior poder absorvente que a amostra antiga em relação a um soro preparado com amostra recente.

Experiência semelhante à precedente foi feita empregando as amostras *Cão B* e *J.A.*, ambas recentemente isoladas, a primeira visceral e a segunda tegumentar, cujo protocolo damos a seguir :

1.ª pesagem { Tubo 1 (*Cão B.*) 6,911 g.
Tubo 2 (*J.A.*) 6,947 g.

2.ª pesagem { Tubo 1 — 7,052 g.
Tubo 2 — 7,090 g.

Diferença { Tubo 1, 7,052 — 6,911 = 0,141 g.
Tubo 2, 7,090 — 6,947 = 0,143 g.

Juntamos, a cada tubo, soro anti-*Florisvaldo* a 1% em quantidades proporcionais ao peso de *Leishmanias*, isto é, tubo 1, 2,82 cc.; tubo 2, 2,86 cc. Absorção, duas horas a 37°, centrifugação e prova de aglutinação com amostra *Cão B*, cujo resultado damos no quadro n. 45.

QUADRO 45

AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS

8-8-1938

Soro anti-chagasi (Amostra Florisvaldo)

Aglutinação, com amostra Cão B

DILUIÇÕES	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800	1/25600	1/51200	1/102400	TEST
Soro em natureza.....	++++	++++	++++	++++	+++	+++	+++	++	+	—
Soro Florisvaldo, absorvido com Cão B.....	+++	+++	+++	++	+	—	—	—	—	—
Soro Florisvaldo, absorvido com J. A.....	+++	+++	+++	++	+	—	—	—	—	—

Essa experiência demonstra que duas amostras, recentemente isoladas, de espécies diferentes, teem igual poder absorvente, o que constitue mais uma prova da identidade da constituição antigênica das amostras recentemente isoladas, mesmo quando pertencem a espécies diferentes.

Embora a experiência do quadro n. 44 demonstre o maior poder absorvente de uma amostra recente em relação a um soro preparado com amostra nas mesmas condições, ela não permite excluir a existência nessas amostras do antígeno *vi*, pois o maior poder absorvente poderia resultar da absorção simultânea do antígeno comum e do antígeno *vi*, pela amostra recente que, deixado em liberdade pela amostra antiga, seria o responsavel pela diferença observada. Teriamos, assim, para explicar o resultado da experiência do quadro n. 44, duas hipóteses: ou a maior riqueza das amostras recentes em antígeno comum, ou a existência, ao lado desse antígeno, do antígeno *vi* peculiar às amostras em questão.

Para verificar qual das duas hipóteses corresponde à realidade, fizemos nova experiência em que um soro preparado com amostra recente foi absorvido por quantidades iguais de duas amostras, uma recentemente isolada e outra antiga, fazendo os soros assim absorvidos atuar, não só sobre uma amostra recentemente isolada, como sobre uma amostra antiga. Como essa última não contem o antígeno *vi*, não se deveria observar aqui a diferença existente quando os soros atuam sobre amostra recente, no caso em que esse antígeno fosse realmente a causa da diferença do poder absorvente. A persistência da diferença em questão viria então demonstrar claramente que o maior poder absorvente das amostras recentes corre realmente por conta da maior riqueza em antígeno comum e não da existência do antígeno *vi* nas amostras recentes.

Essa experiência foi feita utilizando a amostra *Isaias*, de *L. chagasi* (recentemente isolada), e a amostra *Jerichó*, de *L. tropica* (amostra antiga). Nessa experiência empregamos menor quantidade de soro em relação ao peso de Leishmanias, isto é, utilizamos apenas 0,01 cc. da diluição a 1% do soro para cada miligramo de corpos de flagelados. Assim procedendo aumentamos a proporção de *Leishmanias* empregadas na absorção o que, a nosso ver e de acordo com os resultados das experiências anteriores viria tornar mais nítidas as diferenças observadas. Com os soros assim absorvidos, procedemos as provas de aglutinação, tanto com a amostra *Isaias* (recentemente isolada) como com a *Jerichó* (antiga), fazendo simultaneamente a prova com o soro em natureza, da mesma maneira que nas experiências anteriores. Damos a seguir o protocolo dessa experiência.

Experiência semelhante à precedente, mas empregando a amostra *Isaias* (*L. chagasi* recentemente isolada) e *Jerichó* (*L. tropica* antiga):

1.ª pesagem { Tubo 1 (*Isaias*) — 6,999 g.
Tubo 2 (*Jerichó*) — 6,987 g.

2.ª pesagem { Tubo 1 — 7,180 g.
Tubo 2 — 7,171 g.

Diferença { Tubo 1, 7,180 — 6,999 = 0,181 g.
Tubo 2, 7,171 — 6,987 = 0,184 g.

Juntamos a cada tubo soro anti-*Florisvaldo* a 1% em quantidades proporcionais ao peso de Leishmanias, isto é, tubo 1, 1,81 cc.; tubo 2, 1,84 cc. Absorção, duas horas na estufa a 37°, centrifugação e prova de aglutinação com as amostras *Isaias* e *Jerichó*, quadros ns. 46 e 47.

QUADRO 46

AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS

15-6-1938

Soro anti-chagasi (Amostra Florisvaldo)

Aglutinação com a amostra Isaias

DILUIÇÕES	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/640	1/12800	1/25600	1/51200	TEST.
Soro em natureza	++++	+++	+++	+++	++	+	+	—	—
Soro Florisvaldo, absorvido com Isaias	+	+	—	—	—	—	—	—	—
Soro Florisvaldo, absorvido com Jerichó	+++	+++	++	+	+	—	—	—	—

QUADRO 47

AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS

15-9-1938

Soro anti-chagasi (Amostra Florisvaldo)

Aglutinação com a amostra Jerichó

DILUIÇÕES	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800	1/25600	1/51200	TEST.
Soro em natureza	++	++	+	+	—	—	—	—	—
Soro Florisvaldo, absorvido com Isaias	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Soro Florisvaldo, absorvido com Jerichó	+	+	—	—	—	—	—	—	—

Empregando para aglutinação a amostra *Isaias,* obtivemos diferença nítida entre o poder aglutinante dos soros absorvidos por cada uma das amostras, mostrando a amostra *Isaias,* recentemente isolada, um poder absorvente bem maior que a amostra antiga *Jerichó,* o que vem confirmar a experiência anteriormente feita com outras amostras. Utilizando para a aglutinação a amostra *Jerichó,* antiga, essa diferença persiste aproximadamente na mesma proporção, o que demonstra claramente que a diferença do poder absorvente das amostras recentes não corre por conta da existência de um antígeno peculiar a essas amostras e sim pela maior riqueza delas em antígeno comum. Fica, assim, resolvida a questão que desejavamos esclarecer.

Outra conclusão a que chegamos era que as amostras conservadas em cultura por largo tempo sofrem alterações em sua constituição antigênica.

Seria, pois, interessante verificar a ocorrência dessa modificação em uma mesma amostra. Foi o que fizemos nas experiências seguintes praticadas com a amostra *J.A.*, de *L. Brasiliensis*, três anos após sua conservação em cultura.

Empregamos nessas experiências dois soros, ambos preparados com essa amostra, um quando recentemente isolada (1937) e outro três anos mais tarde (1940).

Com o soro preparado, em 1937, com a amostra recentemente isolada, executamos as experiências que constam dos quadros ns. 48 e 49, empregando para comparação a amostra *N.T.I.*, de *L. chagasi*, recentemente isolada.

QUADRO 48

AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS

Soro preparado em 1937 com L. brasiliensis (Amostra J. A.) recentemente isolada (1937)

Soro em natureza

AMOSTRA	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800	1/25600	1/51200	TEST.
J. A. (*L. brasil.*)	++++	+++	+++	++	+		—	—	—	-
N. T. I (*L. chagasi*)	++++	+++	++	++	+				—	—

QUADRO 49

O mesmo soro absorvido pela L. chagasi (Amostra N. T. I.)

AMOSTRA	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800	TEST.
J. A. (*L. brasil.*)	—	—	—	—	—	—	—
N. T. I. (*L. chagasi*)	—	—	—	—	—		—

No primeiro desses quadros empregamos o soro em natureza, que aglutinou em igual título as duas amostras; no segundo, o mesmo soro absorvido pela amostra *N.T.I.*, de *L. chagasi*. Nesse último, o soro não mais aglutinou ambas as amostras, o que prova a identidade de constituição antigênica de uma amostra de *L. chagasi*, recentemente isolada com outra de *L. brasiliensis*, quando tambem recentemente isolada, confirmando os resultados anteriormente obtidos. Com soro preparado em 1940, com a mesma amostra, conservada, porem, em cultura por cerca de três anos, fizemos experiência semelhante às anteriores e cujos resultados constam dos quadros ns. 50 e 51.

QUADRO 50

AGLUTINAÇÃO DE LEISHMANIAS

21-11-1940

Soro preparado em 1940 com L. brasiliensis (Amostra J. A.) isolada cerca de três anos antes (1937)

Soro em natureza

AMOSTRA	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/5400	1/12800	1/25600	1/51200	TEST.
J. A. (*L. brasil.*).....	++++	++++	++++	++++	++	+	+	—	—	—
N. T. I. (*L. chagasi*).)....	++++	++++	+++	+++	++	+	—	—	—	—

QUADRO 51

O mesmo soro absolvido pela L. chagasi (amostra N. T. I.)

AMOSTRA	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800	TEST.
J. A. (*L. brasil.*).....	++++	+++	+++	++	++	+	—
N T. I. (*L. chagasi*).....	—	—	—	—	—	—	—

No primeiro desses quadros, vemos que o soro em natureza aglutinou ambas as amostras a títulos semelhantes; no segundo, em que utilizamos o mesmo soro absorvido com a amostra *N.T.I.*, enquanto essa última amostra não era mais aglutinada, a amostra *J.A.* o era em alto título, o que prova ter essa amostra sofrido profunda alteração em sua constituição antigênica durante o prazo de três anos em que foi conservada em cultura.

Uma outra experiência foi tambem executada com a amostra *J.A.*, três anos após o seu isolamento e com o soro preparado com a mesma, comparando-a com outra amostra de *L. brasiliensis* recentemente isolada, a amostra *Batista*. quadros ns. 52 e 53.

Na primeira dessas experiências, que consta do quadro n. 52, executada com o soro em natureza, ambas as amostras foram aglutinadas a igual título; na segunda, (quadro n. 53), em que utilizamos para absorção a amostra *Batista*, essa não mais foi aglutinada, enquanto que a amostra *J.A.* apresentou apenas pequena baixa no título de aglutinação. O resultado dessa

última experiência deixa ver que duas amostras da mesma espécie podem apresentar constituições antigênicas diferentes, de acordo com o prazo por que foram conservadas em cultura.

QUADRO 52

6-12-1940

Soro preparado em 1940 com L. brasiliensis (Amostra J. A.) isolada cerca de três anos antes (1937)

Soro em natureza

AMOSTRA	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	1/12800	1/25600	1/51200	TEST.
J. A (*L. brasil.*).....	++++	++++	++++	+++	++	—		—	—	—
Baptista (*L. brasil.*).....	++++	+++	+++	+	+	—	—	—	-	-

QUADRO 53

O mesmo soro absorvido pela L. brasiliensis (Amostra Baptista)

AMOSTRA	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	1/6400	TEST.
J. A. (*L. brasil.*).....	++	+++	++++	+	—	—	—
Batista (*L. brasil.*).....	—	—	—	—	—	—	—

Discussão : Ao iniciarmos nossas pesquisas sobre aglutinação das *Leishmanias*, não tínhamos um plano de trabalho prestabelecido de maneira que, no decurso das pesquisas, os resultados de uma série de experiências, serviram para estabelecer as normas a seguir nas experiências seguintes. Assim procedendo, durante a descrição da parte experimental, fomos forçados a incluir as principais conclusões a que chegamos, de modo que, no presente capítulo, nos limitaremos a fazer algumas considerações sobre essas conclusões e seus fundamentos, bem como sobre a nossa maneira de interpretar os resultados obtidos.

A primeira conclusão a que chegamos é a da existência de um *antígeno comum* a todas as Leishmanias quaisquer que sejam as espécies a que pertençam, qualquer que seja o tempo por que foram conservadas em cultura. Não é preciso insistir sobre os fundamentos dessa conclusão. Trabalhamos

com 26 amostras, pertencentes à todas as espécies admitidas, das mais diversas proveniências, empregamos em nossas experiências, soros preparados com 10 dessas amostras e nem uma só vez deixamos de observar o fenômeno de aglutinação.

Outra conclusão de grande importância é a que estabelece que todas as amostras recentemente isoladas, mesmo as de espécies diferentes, possuem idêntica constituição antigênica. A demonstração desse fato, em relação às amostras de uma mesma espécie foi bem fundamentada em relação a *L. chagasi,* como se vê nos quadros ns. 26 e 28. Quanto à identidade antigênica das amostras recentemente isoladas de espécies diferentes, a documentação não é tão abundante como desejaríamos. Trabalhamos apenas com amostras recentemente isoladas de três espécies diferentes, *L. chagasi, L. brasiliensis* e *L. donovani.* Essas amostras são, uma tegumentar e duas outras viscerais, sendo que essas últimas divergem, não só pela forma da doença que dão origem, como por sua distribuição geográfica. Queremos chamar particularmente a atenção para esse ponto. Realmente, se tivéssemos trabalhado com o mesmo número de espécies, mas que fossem todas viscerais, como no caso de serem elas as *L. donovani, L. infantum* e *L. chagasi,* seria lógico admitir que a identidade de constituição antigênica decorria do fato de pertencerem todas as *Leishmanias viscerais* a uma mesma espécie, fato, aliás, admitido por grande número de pesquisadores.

Ainda trabalhando com o mesmo número de espécies, mas que fossem todas provenientes do velho mundo, como no caso de serem elas as *L. donovani, infantum* e *tropica,* poder-se-ia ainda pensar que fosse a proveniência a causa da identidade da constituição antigênica observada. No caso, porem, qualquer dessas hipóteses fica desde logo excluida, de modo que, se pode, com boas razões, estender a conclusão a todas as espécies. Ocorre ainda que, conforme será exposto posteriormente, as leishmanias, quando recentemente isoladas, apresentam em sua constituição antigênica unicamente o antígeno comum já referido. Ora, as amostras de *L. infantum* e *L. tropica* com que trabalhamos, embora conservadas em cultura por longo tempo, possuiam o mesmo antígeno comum encontrado nas amostras de outras espécies, o que constitue forte argumento em favor de apresentarem tambem as amostras dessas espécies, quando recentemente isoladas, a mesma constituição antigênica que as demais.

A afirmação que fizemos anteriormente de que as amostras recentemente isoladas são unicamente constituidas pelo antígeno comum, decorre das experiências que fizemos com o fim de verificar da existência ou não de um antígeno peculiar às amostras recentes. Ora, as experiências que constam dos

quadros ns. 46 e 47 demonstram claramente a inexistência de um tal antígeno, donde se pode concluir que as amostras recentemente isoladas são constituidas unicamente pelo antígeno comum acima referido.

Uma terceira conclusão é de que as amostras de leishmanias, quando conservadas em cultura por longo tempo, sofrem alterações em sua constituição antigênica, modificações essas que independem da espécie a que pertencem. Já vimos as numerosas experiências que permitiram chegar a essa conclusão. Vimos, a princípio, as diferenças nítidas observadas entre as amostras de *L. chagasi* e as das demais espécies com que eram comparadas, o que permitia mesmo pensar na possibilidade da separação das espécies pelo emprego da soro-aglutinação. Vimos depois que experiências tendentes a separar as outras espécies entre si, nos levou a resultados contraditórios, ora separando amostras de uma mesma espécie, ora aproximando amostras de espécies diferentes. Daí, era lícito concluir que as diferenças observadas entre as amostras de *L. chagasi* e as demais, não corriam por conta de diferenças específicas e sim de outras condições, que deveria ser a idade das amostras, pois todas as amostras de *L. chagasi,* com que trabalhamos, eram recentemente isoladas, enquanto que todas as demais eram antigas. Fomos assim levados a comparar entre si amostras recentemente isoladas de espécies diferentes, o que nos permitiu chegar à conclusão exposta anteriormente. Ora, se as amostras recentemente isoladas possuem idêntica constituição antigênica e se depois, quando conservadas em cultura por longo tempo, elas se mostram diferentes, a única explicação é que elas sofreram, durante o período em que foram conservadas em cultura, modificações em sua constituição antigênica responsaveis pelas diferenças observadas. Essas modificações puderam ser verificadas em uma mesma amostra, a amostra J.A. realmente, enquanto o soro preparado com essa amostra em 1937, época em que foi isolada, absorvido pela amostra N.T.I. de *L. chagasi* recentemente isolada, se mostrou completamente inativa, o soro preparado com a mesma amostra três anos depois e absorvido pela mesma amostra N.T.I. ainda aglutinava a título elevado a amostra J.A. Fato semelhante foi tambem observado utilizando para absorção uma amostra da mesma espécie, mas recentemente isolada, a amostra *Batista*. Qual a natureza das modificações na constituição antigênica das Leishmanias quando conservadas por longo tempo em cultura? Já vimos que as Leishmanias quando recentemente isoladas não possuem nenhum antígeno que lhes seja peculiar e que se pudesse assemelhar ao antígeno *vi* encontrado nas bactérias. Elas são constituidas unicamente pelo *antigeno comum* já referido. Queremos assinalar que é provavel que esse *antígeno* não seja único e sim constituido por um grupo de antígenos e nós mesmos, em nota publicada no "C. R. Soc. de Biol.", assinalamos a separação

nas *Leishmanias*, de pelo menos dois antigenos, um flagelar e outro somático, à semelhança do que ocorre com as bactérias.

Por outro lado, as amostras antigas apresentam-se mais pobres em antigeno comum que as recentemente isoladas e deixam ver ao lado dele a existência de outros antigenos formados durante o envelhecimento das amostras em cultura. Como o aparecimento desses outros antigenos, coincidem com a diminuição do antigeno comum, tudo leva a crer que esses antigenos se formem a custa do antigeno comum. Daí propormos para o antigeno *comum* das Leishmanias a denominação de antigeno *primário* ou *primitivo* enquanto reservamos o nome de antigenos *secundários* àqueles que se formam pelo envelhecimento das amostras em cultura. Uma vez que esses antigenos secundários não são de modo algum específicos, julgamos que sua formação dependa das condições de cultura, tais como composição do meio, temperatura, tempo por que foram conservadas em cultura, etc.

As conclusões a que chegamos em nosso trabalho não constituem um fato isolado, em meio de nossos conhecimentos sobre a soro-aglutinação, pois entre as bactérias tambem se observam modificações antigênicas provocadas pela conservação das mesmas em cultura por longo tempo, existindo contudo, uma diferença fundamental, pois as bactérias apresentam sempre um antigeno específico o que não acontece nas *Leishmanias*. Duas hipóteses podem ser formuladas para explicar essa diferença ; ou os Protozoários não apresentam aglutininas específicas, sendo portanto impossivel a separação das espécies por esse meio ou as *Leishmanias* constituem, quaisquer que sejam as diferenças observadas, uma única espécie; hipótese já aventada por alguns autores.

Os nossos conhecimentos sobre a aglutinação de Protozoários são ainda muito parcos para que se possa formar opinião sobre qual das hipóteses corresponde à realidade. Somente estudos posteriores detalhados, não só, com *Leishmanias* como com outros flagelados, poderão permitir futuramente esclarecer a questão.

Conclusões

1.ª Toda a *Leishmania*, qualquer que seja a espécie a que pertença, e o tempo por que tenha sido conservada em cultura, apresenta um *antigeno comum*.

2.ª As *Leishmanias*, quando recentemente isoladas, mesmo de espécies diferentes, apresentam idêntica constituição antigênica e possuem unicamente o *antigeno comum* já referido.

3.ª As *Leishmanias,* quando conservadas em cultura por longo tempo, sofrem modificações em sua constituição antigênica com o aparecimento de *antigenos secundários,* cuja natureza não depende da espécie a que pertence.

4.ª O aparecimento desses *antigenos secundários* é acompanhado de diminuição do *antigeno comum,* o que leva a crer que os *antigenos secundários* se formem à custa do *antigeno comum* que, por esse motivo, denominamos tambem *antigeno primitivo.*

5.ª Do que ficou dito pode-se concluir que a reação de soro-aglutinação não se presta à separação das espécies do gênero *Leishmania.*

AGGLUTINATION OF LEISHMANIAS. SUMMARY

The first agglutination experiments (Tables 1 and 2) showed that the serum obtained with any one strain of *Leishmania,* agglutinates all the others even of another species. This finding reveals the existence of a common antigen. However as the titre of agglutination did not permit a sharp differentiation of species we tried the adsorption method.

The first adsorption tests made demonstrated differences in antigenic constitution between a strain of *L. donovani* on one hand and strains of *L. tropica* or *L. brasiliensis* on the other.

Further experiments in which *L. chagasi* was tested against the other species revealed that the former was antigenically different from the others.

These tests were performed by adsorbing an anti-chagasi serum with organisms belonging to the other species or, conversely, adsorbing with *L. chagasi* sera prepared against the other species (See Tables 9 to 24).

On the other hand, the adsorption of a serum prepared against one strain of *L. chagasi* by another of the same species showed that they had identical antigenie constitution.

These findings suggested the possibility of separating different species of *Leishmania* by this method. However, tests to separate the other species from one to another gave inconclusive results. (See Tables 27 to 35).

It was soon observed that all the strains of *L. chagasi* were of recent isolation while all the others had been maintained in artificial culture media for a long time. We were led to believe that this condition was responsible for the differences in behaviour encountered.

Accordingly, recently isolated strains of *L. brasiliensis* and *L. donovani* were tested and shown to be antigenically similar to strains of *L. chagasi* also recently isolated.

The conclusion may be drawn that all strains have the same antigenic constitution when freshly isolated.

It has been noted that when a serum which has been prepared against a freshly isolated is adsorbed with an old strain, the amount of agglutinins left free, is much smaller than when a serum prepared against an old strain is adsorbed with a newly isolated strain.

At first, we thought to explain this by the low titre of the serum. However, the amount of agglutinins left free was not larger when higher titre serum was tested.

These results do not corroborate the view of a special antigen being present in recently isolated strains (*vi antige*) but rather that the phenomenon is dependent on differences of the amount of the common antigen, more abundant in recent strains.

In order to make this clear, experiments were made in which equal amounts of a serum prepared against a newly isolated strain were adsorbed by equal amounts, by weight, of, on one hand, a new strain, and the other an old strain. The resulting adsorbed sera were then titrated. (Table 44).

Results showed that newly isolated strains adsorb a larger amount of agglutinins (Tables 44, 45).

Two hypothesis have bem advanced to explain the stronger adsorbing qualities of the newly isolated strains.

1.° — these strains possess larger amounts of the common antigen and 2.° — they contain a *vi antigen* which adsorbed by the new strain together with the common antigen is the cause of their larger adsorbing capacity.

To find out which of the two hypothesis corresponds to the reality a new experiment was made, similar to the one summarized in table 44.

The adsorbed sera were made to act on a recently isolated strain as well as on an old one. The latter, not containing the *vi antigen,* the difference seen when sera act on new strains should not be observed here in the case of this antigen being responsaible for the differences in adsorbing properties.

The difference persisting, the indication would be that the greater adsorbing capacity of recently isolated strains was really related to larger amounts of the common antigen present (Tables 46 and 47).

The results of the experiment excluded the possibility of the *vi antigen* being responsible.

Other experiments, (Tables 48 to 53) using a 3 year old strain, demonstrated the modification in its antigenic constitution during the period it was maintained in cultures.

CONCLUSIONS

1. All Leishmanias, irrespective of species or length of time during which they have been kept in cultivation contain a *common antigen*.

2. Recently isolated Leishmanias, even when they belong to separate species, have identical antigenic constitution and possess only the *common antigen* mentioned above.

3. Leishmanias maintained in cultures for long time are subjected to a modification in their antigenic constitution whereby secondary antigens appear. The nature of these antigens does not depend on the species.

4. The appearance of these *secondary antigens* is accompanied by decrease in the *common antigen*. This suggests that the *secondary antigens* originates from the *common antigen*, for this reason, also designated as *primitive antigen*.

5. The final conclusion is that the serum-agglutination test is of no avail in separating species of the genus *Leishmania*.

Contribuição ao estudo da Tripanosomiase Americana *

por

Bichat de Almeida Rodrigues

e

Gervásio de Brito Melo

(Com 1 mapa e 2 estampas)

A Tripanosomíase Americana foi dos principais assuntos de que se ocupou o Serviço de Estudo das Grandes Sndemias (S.E.G.E.) em 1940, ano em que se viu privado da direção de EVANDRO CHAGAS, cujo desaparecimento constituiu perda dificilmente reparavel para a medicina experimental do País.

Com a colaboração dos técnicos do Instituto Ezequiel Dias — que até à sua recente extinção foi, ao lado do Instituto Oswaldo Cruz, por mais de 20 anos, importante centro de pesquisas para a resolução dos problemas médicos nacionais — incrementou-se apurado estudo epidemiológico em zonas ainda não estudadas em Minas Gerais, cujos primeiros resultados foram já relatados por MARTINS, VERSIANI & TUPINAMBÁ (9).

Em seguida, por suas condições ecológicas especiais, foi indicada a Amazônia, como região para novas pesquisas, facilitadas pela existência em Belem, do Instituto de Patologia Experimental Evandro Chagas (IPEEC), sede dos trabalhos do SEGE no norte.

Ao contrário do Estado de Minas, onde já eram numerosos os dados conhecidos sobre a moléstia de Chagas antes dos trabalhos acima referidos, na Amazônia pouco se sabia sobre o assunto. Dos raros dados colhidos, grande parte era fruto de excursões anteriores dos técnicos do SEGE.

Vejamos, primeiramente, as referências quanto aos transmissores :

a) *Triatoma rubrofasciata* (DE GEER, 1773). Existem vários exemplares na coleção Lutz, provenientes de Belem (Pará); em 1910, sem marcação de colecionador; em 1917, colecionado por PERYASSÚ;

* Recebido para publicação a 16 de março e dado à publicidade em abril de 1942.

Trabalho do Serviço de Estudo das Grandes Endemias do Instituto Oswaldo Cruz (Manguinhos) — Superintendente interino : Professor Carlos Chagas Filho.

em 1921 colecionado por Oscar de Carvalho. Desde 1912, NEIVA referira a espécie no Pará.

b) *Rhodnius brethesi*, DA MATTA, 1919. Descrito de BARCELOS, Rio Negro (Amazonas).

c) *Rhodnius pictipes*, STAL, 1872. Colecionado em Manaus em 1924 por DA MATTA. Encontrado pelo SEGE em 1938 em Igarapé Miry (Pará). Em 1938, CASTRO FERREIRA & DEANE (2) infectaram experimentalmente esta especie com o *S. cruzi*.

d) *Panstrongylus geniculatus* LATREILLE, 1811. Assinalado por PINTO em 1925, em Tefé (Amazonas). Encontrado pelo SEGE em 1938 em Igarapé Miry (Pará).

e) *Rhodnius robustus* LAROUSSE, 1927. Boca do Tefé (Amazonas), segundo LAROUSSE, 1927.

f) *Panstrongylus lignarius*, WALKER, 1873. Colecionado pelo SEGE em 1938 em Piratuba, Abaeté (Pará) e determinado por COSTA LIMA.

g) *Cavernicola pilosa* BARBER, 1937, recentemente encontrado em Marajó em ocos de arvores contendo morcegos infectados. 42,1% dos *Cavernivola* examinados apresentavam flagelados no conteudo intestinal (DIAS, MELO, COSTA, DAMASCENO & AZEVEDO, 1942, Rev. Brasil. Biol., *2*:103-110).

Vejamos agora, os dados quanto aos depositários do parasito :

Por sugestão de CARLOS CHAGAS, SOUZA ARAUJO e ABEN-ATHAR (1922) examinaram, a fresco, o sangue de vários lotes de "macacos de cheiro" (*Sciureus sciureus*) do Baixo Amazonas, encontrando 45% deles infectados por um tripanosoma que mais tarde aquele pranteado professor (1924) identificou ao *Schizotrypanum cruzi*.

Durante os trabalhos do SEGE na região do estuário do Amazonas, foram verificados mais os seguintes depositários : tatú (*D. novemcinctus*) e mucúra (*D. marsupialis*), ambos já referidos em outras regiões.

Alem disto, verificou-se a existência de esquizotrípanos em morcegos.

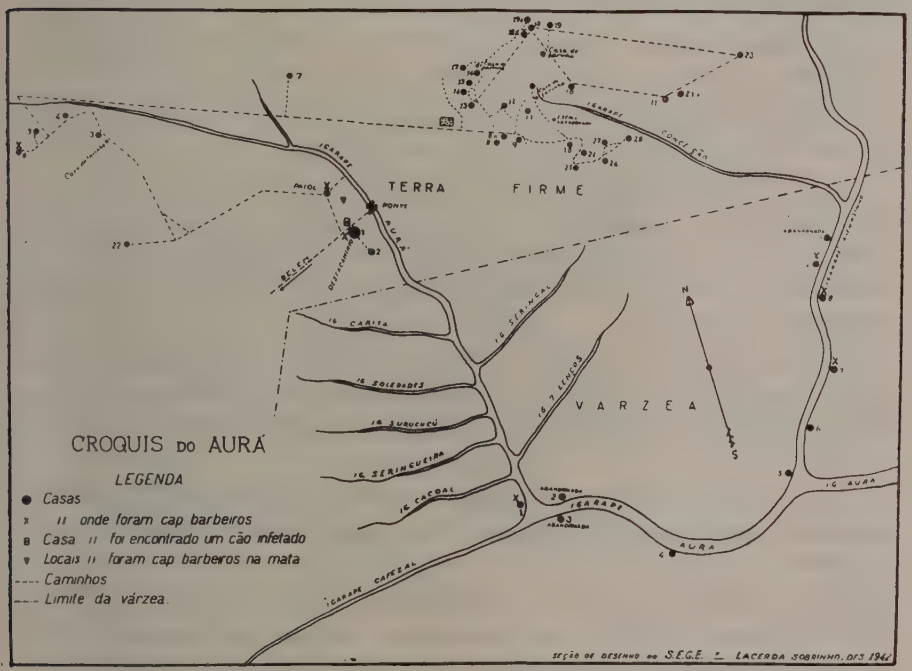
Foram assinalados, tambem, depositários ainda não conhecidos, como a mucura xixica (*Marmosa cinerea*) (7) e irara (*Tayra barbara*) (1).

Tais eram as indicações sobre a doença de Chagas na Amazônia.

ESTUDO DA REGIÃO

O local escolhido para início dos trabalhos, foi a localidade Aurá, banhada pelo igarapé do mesmo nome, afluente do rio Guamá, sede do antigo depósito

de pólvora da 8.ª Região Militar, situado próximo a Belem, 10 Km. mais ou menos, e na qual os técnicos do SEGE já tinham constatado a existência de Triatomídeos e depositários silvestres do *S. cruzi*. Os trabalhos prolongaram-se de fevereiro a dezembro de 1940.



Compreende o Aurá (vide mapa) duas partes perfeitamente distintas e típicas do Baixo Amazonas: *várzea* e *terra firme*. Visto ambas terem sido descritas em outra publicação do SEGE (5), daremos aqui apenas alguns detalhes relativos ao local das pesquisas.

Como a várzea consiste em terrenos sujeitos à influência das marés nas duas oscilações diárias, as habitações são construidas bem acima do solo, afim de não serem invadidas pelas águas. Todas as casas, nesta parte do Aurá, são construidas nas margens dos "igarapés" (riachos). (figuras 1 e 2).

Na terra firme, formada de terrenos mais elevados, nunca invadidos pelas águas, quasi todas as habitações são construidas ao rés-do-chão. (figuras 3 e 4).

Tanto na várzea como na terra firme, as casas ficam inteiramente dentro da mata, que as envolve, ficando apenas exigua faixa de terreno descoberto

em torno de cada uma delas. E' frequente um dos lados da casa, quasi tocar a mata.

As estações do ano se resumem, como em toda a Amazônia, ao verão e inverno. O primeiro vai de junho a dezembro: é o período de estio. O inverno, de janeiro a maio: é a estação das águas.

A umidade ambiente, sempre muito elevada, atinge quase à saturação completa, nos meses de inverno mais intenso.

A mata existente na região é primitiva (Fig. 5). Apenas em raros pontos veem-se os claros abertos pelas queimadas.

A população, composta de 117 indivíduos distribuidos por 42 casas, em geral tem hábitos rudimentares. Trabalha na extração da borracha e no preparo do carvão, farinha de mandioca e couro de animais silvestres. Alimenta-se de farinha de mandioca e produtos da caça e pesca, abundantes e variados, raramente de frutos.

E' constituida em sua maior parte por caboclos, com pequena mescla de elementos nordestinos. Suas principais doenças são a malária e as helmintoses. Vários deles já conheciam o *barbeiro*, a que denominam *bruxa*.

Os principais fatores epidemiológicos foram encarados no programa dos trabalhos : o homem, o parasito, os transmissores e os depositários dos parasitos.

A pesquisa dos parasitos, no homem e nos animais, foi feita pelo exame direto do sangue (a fresco e em gota espessa) e pelo xenodiagnóstico. Para este último, não foi possivel, como pretendiamos, usar as espécies locais mais comuns (*P. geniculatus* e *R. pictipes*). Foram utilizadas, então, as seguintes: *Triatoma infestans, Panstrogylus megistus, Rhodnius prolixus* e *Triatoma maculata*, provenientes das criações dos laboratórios do SEGE no Rio e em Belo Horizonte, assim como as de Belem.

PESQUISAS RELATIVAS AO HOMEM

Todos os habitantes, em número de 117 (89 da terra firme e 28 da várzea) foram submetidos a detalhado exame clínico, ao xenodiagnóstico e ao exame de sangue, com os seguintes resultados :

Exame de sangue : Todos negativos.

Xenodiagnósticos : Todos negativos. Cada pessoa foi sugada por 3 "barbeiros" cujas fezes foram examinadas depois, de 15 em 15 dias, até se

completarem 60 dias, a partir da época em que os insetos se alimentaram no homem.

Exames clínicos : Não se conseguiu evidenciar nenhum sinal que fizesse suspeitar da doença de Chagas. Não foram observados sintomas de lesões cardíacas atribuiveis à moléstia ; não houve referência, entre a população, de morte súbitas.

Por motivos independentes da nossa vontade, não nos foi possivel empregar a técnica electro-cardiográfica, a qual fazia parte do plano de trabalho.

PESQUISAS RELATIVAS AOS ANIMAIS DOMÉSTICOS

Foram examinados 5 cães e 1 gato.

Os cães pertenciam, 4 à casa 1 da terra firme e o 5.º à casa 1 da várzea. (vide mapa). Os resultados são os seguintes :

Exames de sangue : Todos negativos.

Xenodiagnósticos : Feitos com a mesma técnica antes descrita. Foi positivo o de um cão pertencente à casa 1 da terra firme (cão "Ligeiro", figura 8). Em dois dos 3 insetos que sugaram este animal, foram encontradas fórmas em critídia, 20 dias depois do repasto infectante.

O número de animais domésticos examinados foi insuficiente. Isto se deu porque os mesmos fugiam à nossa aproximação, no que eram facilitados pelos seus donos. Todavia, eram relativamente escassos no local.

PESQUISAS RELATIVAS AOS ANIMAIS SILVESTRES

Quando estes animais eram apanhados mortos, colhia-se o sangue do coração para a pesquisa direta do parasito. Se capturados vivos, fazia-se tambem o xenodiagnóstico.

Exames de sangue : Foram encontrados 9 positivos, dos 115 animais examinados. (vide quadro I).

Xenodiagnósticos : Foram encontrados 15 positivos, dos 47 animais assim examinados. (vide quadro II).

O estudo comparativo dos quadros I e II, mostra que enquanto para os tamanduás foram idênticos os resultados do exame de sangue e do xenodiagnóstico, para as mucuras, tal não aconteceu. Ao exame de sangue estas foram todas negativas, ao passo que das 12 que foram submetidas ao xenodiagnóstico, 11 apresentaram-se infectadas. Por outro lado, os cinco morcegos que

se mostraram positivos ao exame de sangue, foram negeativos ao xenodiagnóstico.

Este último fato parece estar de acordo com as observações de E. Dias (7) que verificou o mesmo nos morcegos *L. ecaudata* e *C. perspicillata* infectados com *Schizotrypanum vespertilionis*.

QUADRO I

EXAMES DE SANGUE DE ANIMAIS SILVESTRES DO AURÁ

ESPÉCIES EXAMINADAS	N. DE EXEMPLARES	POSITIVOS
Tamanduá colete (*T. tetradactylus*)	12	3
Mucura (*Didelphis sp.*)	18	0
Mucura xixica (*M. cinerea*)	15	0
Tatú (*D. novemcinctus*)	5	0
Macaco da noite (*P. flavus*)	2	0
Macaco de cheiro (*S. sciureus*)	6	0
Macaco chuim (*M. ursulus*)	1	0
Irara (*T. barbara*)	4	1
Raposa (*C. brasiliensis*)	1	0
Coatí (*N. narica*)	2	0
Coatipurú (*S. aestuans*)	3	0
Paca (*C. paca*)	5	0
Rato sauiá (*Proechymis sp.*)	2	0
Morcegos (Não determinados)	39	5
TOTAL	115	9

NOTA — Os exemplares de morcegos se perderam quando a caminho do Rio para determinação.

QUADRO II

XENODIAGNÓSTICO DE ANIMAIS SILVESTRES DO AURÁ

ESPÉCIES EXAMINADAS	N. DE EXEMPLARES	POSITIVOS
Tamanduá colete (*T. tetradactylus*)	12	3
Mucura (*Didelphis sp.*)	12	11
Mucura xixica (*M. cinerea*)	6	0
Tatú (*) (*D. novemcinctus*)	3	1
Macaco da noite (*P. flavus*)	1	0
Raposa (*C. brasiliensis*)	1	0
Paca (*C. paca*)	1	0
Rato sauiá (*Proechymis sp.*)	1	0
Morcegos (Não determinados)	8	0
Tatú rabo de couro (?)	1	0
TOTAL	46	15

(*) — Figura 6.

O encontro de tamanduás (fig. 7) infectados por *Schizotrypanum* ainda não tinha sido assinalado anteriormente.

PESQUISAS RELATIVAS AOS TRANSMISSORES

Foi feita a procura sistemática de Triatomídeos, em todas as suas fases evolutivas, dentro e fora dos domicílios, durante os 11 meses de trabalho.

a) *Nos domicílios* : Pelo menos de 15 em 15 dias, era feita cuidadosa captura em cada domicílio, alguns dos quais eram inspecionados mais frequentemente. Em apenas 7 das 42 casas existentes, foram encontrados "barbeiros" num total de 39 exemplares.

A grande maioria foi capturada na segunda metade do ano, no período de estio. Foram assinaladas as seguintes espécies :

Panstrongylus geniculatus, Rhodnius pictipes e Eratyrus mucronatus.

Nenhuma só vez, foi possivel o encontro de formas evolutivas jovens nos domicílios; todos os exemplares capturados eram adultos. As casas, de um modo geral, não são favoraveis ao desenvolvimento de Triatomídeos. Todavia, embora em número menor, algumas delas oferecem condições que permitem esse desenvolvimento.

As 32 habitações da terra firme distribuem-se pelos seguintes tipos :

a) Paredes e teto de palha, piso de terra batida ou de paxiuba (*Iriartea exarrhiza*).

b) Paredes rebocadas, teto de telhas e assoalhadas.

c) Paredes de barro (sopapo), piso de terra batida, com cobertura de palha ou tacos de madeira.

Em 3 casas da terra firme foram encontrados 27 "barbeiros" ao todo, assim distribuidos :

Casa I:	*Panstrongylus geniculatus*	22	(6 infectados)
Casa 6:	*Rhodnius pictipes*	1	
"Paiol":	*Panstrongylus geniculatus*	3	(1 infectado)
	Eratyrus mucronatus	1	(Classificado por H. LENT)

Esta última espécie é verificação nova para a Amazônia.

As habitações da várzea, em número de 10, (das quais 2 abandonadas) são todas de madeira, cobertas de palha ou telha e construidas cerca de um metro acima do solo. Em 4 delas foram capturados 12 "barbeiros", distribuidos do seguinte modo :

Casa I:	*Rhodnius pictipes*	7	(2 infectados)
Casa 7:	*Panstrongylus geniculatus*	1	
Casa 8:	*P. geniculatus*	1	
Casa 9:	*P. geniculatus*	2	
	R. pictipes	1	

b) *Na mata* : Em plena mata, em uma toca de tamanduá (*T. tetradactylus*), foram encontradas larvas, ninfas e adultos de *P. geniculatus*, estando infectados 2 adultos.

Não muito longe desse local, foi capturada uma larva de Triatomídeo em uma toca de macaco da noite (*P. flavus*). Ambos esses focos de criação ficavam próximos à casa 1 e ao "Paiol" (vide mapa).

O primeiro era, certamente, o foco de origem dos "barbeiros" capturados na casa 1, (fig. 4) na qual funcionava o nosso Posto de Serviço e onde foi verificada a chegada desses insetos, atraídos pela luz.

Pouco tempo depois de terminados os trabalhos, foi coletado no local, em toca de *P. flavus*, por R. Damasceno, entomologista do IPEEC um exemplar adulto de *Panstrongylus rufotuberculatus*, Champion, 1899 (determinado por Herman Lent), o que constitue verificação nova para a região.

PESQUISAS RELATIVAS AO PARASITO

As diversas amostras de *S. cruzi*, isoladas dos transmissores e de depositários, durante o nosso trabalho, estão sendo estudadas nos laboratórios do SEGE no Rio.

Várias observações interessantes veem sendo feitas, como a do fraco póder infectante das raças isoladas da mucura (*Didelphis sp*), do tatú (*D. novemcinctus*) e do tamanduá (*T. tetradactylus*), para os animais de laboratório.

A amostra "cão Ligeiro", embora mais virulenta, pelos estudos biométricos inéditos feitos por E. Dias e L. Freitas, afasta-se das amostras humanas típicas. Contudo, já foi encontrada em um caso de doença de Chagas, proveniente de Minas Gerais, uma amostra de tipo semelhante.

DISCUSSÃO

As condições epidemiológicas por nós observadas em Aurá, são, sob vários aspectos, diferentes daquelas de outras regiões onde foi estudada a doença de Chagas.

O povoado, de população escassa, sendo portanto de mais fácil controle, encontra-se em plena mata, onde as habitações acham-se afastadas umas das outras. Essas casas, na sua grande maioria, não são favoraveis, como já frisámos, ao desenvolvimento dos Triatomídeos. E' certo que algumas delas oferecem condições que permitem esse desenvolvimento. Entretanto, em

nenhuma habitação foi possivel encontrar ovos, larvas ou ninfas de "barbeiros", apesar de demoradas e repetidas pesquisas, durante 11 meses de trabalho.

Nas duas vezes em que foram encontradas as formas evolutivas do transmissor, estas se achavam em tocas de animais silvestres. Desse modo, os adultos capturados nos domicílios, vinham da mata.

Isto parece claro, pois próximo à residência em que foi verificada maior infestação, encontrou-se um foco de criação extra-domiciliar cuja espécie em evolução era a mesma encontrada nesse domicílio (*P. geniculatus*).

Nesta região, a mata é primitiva e relativamente pouco explorada pelo homem, oferecendo consequentemente, rica fauna de vertebrados, em cujas tocas e ninhos, encontram os Triatomídeos farta reserva alimentar. Talvez este fato, ao lado da desfavorabilidade das habitações locais à evolução do transmissor, concorra de algum modo, para retardar a sua adaptação ao ambiente humano.

O confronto dos xenodiagnósticos feitos no homem e nos animais domésticos, com aqueles realizados nos animais silvestres, tambem confirma a conclusão de que os transmissores locais teem hábitos silvestres.

E' verdade que um cão foi encontrado infectado, porem-ainda que fosse mais lógico pensarmos que essa infecção se deu em condições normais de contágio — dado o fato desse animal, como os outros da localidade, alimentar-se muitas vezes de vísceras cruas das caças abatidas, seria admissivel a hipótese do mesmo se ter infectado pela ingestão de animais contaminados, que, como vimos, são em número apreciavel. NATTAN-LARRIER (11) experimentando com camondongos, e E. DIAS (9) com gato doméstico, viram estes animais se infectar pela via digestiva.

Por outro lado, os primeiros estudos biológicos feitos com as amostras de *Schizotrypanum* isoladas de animais silvestres, mostram o fraco poder infectante das mesmas. A própria amostra "cão Ligeiro", mais virulenta, afasta-se, pela biometria, das amostras humanas típicas, embora já tenha sido encontrado um tipo semelhante ao dela em homem, como vimos anteriormente.

Deste modo, dado os hábitos dos transmissores, a natureza dos depositários dos parasitos, a ausência de infecções humanas e, secundariamente, os dados biológicos e biométricos das amostras de *Schizotrypanum* isoladas, é possivel a conclusão de que a Tripanosomíase Americana é silvestre, na região estudada.

Sendo assim, todos estes fatos parecem trazer confirmação à hipótese epidemiológica de C. CHAGAS, (3) que pensava ser a Tripanosomíase Americana uma doença silvestre, com posterior adaptação aos animais domésticos e ao homem.

Por tal motivo, seria interessante realizar-se futuramente, novas investigações em Aurá, afim de se verificar provaveis modificações nas condições epidemiológicas locais. Do mesmo modo, a execução de outra pesquisa nos moldes da que vem de ser efetuada, em outro ponto da Amazônia, serviria para confronto dos resultados.

Por outro lado, o encontro de um animal doméstico infectado, e, precisamente no domicílio em que foi verificada maior infestação pelos transmissores, com elevado índice de infecção, indica a possibilidade do aparecimento de casos humanos. Possivelmente, isto será ainda mais facilitado pela devastação progressiva da floresta, com o consequente afastamento dos animais silvestres, o que pode, de algum modo, concorrer para a adaptação dos Triatomídeos às condições domésticas. CLARK & DUNN (6) observaram no Panamá, o aparecimento de vários casos da doença, em zona onde os transmissores tinham hábitos silvestres e na qual foram feitas derrubadas para fins agrícolas.

Deixamos aqui consignados os nossos agradecimentos ao Dr. H. LENT pela colaboração prestada, determinando a espécie *E. mucronatus* e fornecendo dados sobre os Triatomídeos da Amazônia. Ao Dr. C. ROMAÑA, pelo valioso auxílio que prestou durante o exame clinico da população e ao Dr. E. DIAS pelo fornecimento dos dados biométricos sobre algumas das amostras isoladas.

SUMÁRIO

1) Em trabalho sistematizado, foi estudada pela primeira vez a epidemiologia da doença de Chagas, em um trecho da região do estuário do Amazonas, cujas condições ecólogicas diferem das encontradas em outras zonas onde teem sido feitas pesquisas semelhantes.

2) No local escolhido para estudo — Aurá — uma localidade distante cerca de 10 km. de Belem, (Pará), não foi encontrada nenhuma infecção humana pelo *S. cruzi*, quer pelo exame de sangue, quer pelo xenodiagnóstico, ambos feitos em todos os habitantes (117 indivíduos). Não foi encontrada tambem sintomatologia atribuivel à doença.

3) Em 6 xenodiagnósticos feitos em animais domésticos (5 cães e 1 gato), foi encontrado um cão infectado. Este animal pertencia à casa onde foi verificada maior infestação por Triatomídeos, com índice de infecção elevado. Pelas razões expostas no texto, porem, foi sugerida a hipótese do mesmo se ter infectado pela ingestão de vísceras de animais silvestres contaminados.

4) De 115 animais silvestres, cujo sangue foi examinado em gota espessa, 9 mostraram-se parasitados por *Schizotrypanum* (7,8%). Em 47 verificações pelo xenodiagnóstico, 15 animais silvestres (11 mucuras, 3 tamanduás e 1 tatú) se apresentaram positivos (32,6%). O tamanduá (*T. tetradactylus*) foi pela primeira vez assinalado como depositário natural do *Schizotrypanum*.

5) Como resultado de buscas feitas durante 11 meses, sendo cada domicílio inspecionado pelo menos de 15 em 15 dias, foram encontrados Triatomídeos em 7 das 36 casas existentes no povoado. Todos os 39 exemplares capturados eram adultos; a procura exaustiva não revelou a existência de formas jovens no interior das habitações. Na ordem de frequência, as espécies encontradas foram as seguintes:

P. geniculatus (29 exemplares, dos quais 7 infectados)
R. pictipes (9 " , " " 2 ")
E. mucronatus (1 exemplar, não infectado)

A grande maioria dos insetos foi capturada na segunda metade do ano (época do estío).

6) Em plena mata, n'uma toca de tamanduá (*T. tetradactylus*) foram encontradas larvas, ninfas e adultos de *P. geniculatus*. A casa situada mais próximo desse foco, foi a que apresentou maior infestação (22 exemplares) e exclusiva para essa espécie.

Em uma toca de macaco da noite (*P. flavus*), foi encontrada uma larva de Triatomídeo. Este foco tambem ficava próximo à casa acima referida.

Em toca de *P. flavus* foi tambem achado um exemplar adulto de *Panstrongylus rufotuberculatus*.

7) Amostras de *S. cruzi* isoladas de animais silvestres, mostraram fraco poder infectante. A amostra isolada do cão, embora infectando facilmente os animais de laboratório, pelos estudos biométricos feito por Dias e Freitas, afasta-se das amostras humanas típicas.

8) São discutidos os resultados acima referidos e, pelos hábitos dos transmissores, pela predominância de depositários silvestres do parasito, conclue-se pela natureza silvestre da Tripanosomiase Americana no local estudado.

Se bem que não tenham sido verificadas infecções humanas, dado o encontro de um cão parasitado — infecção esta que se pode ter verificado pelo meio normal da transmissão da moléstia — admite-se a possibilidade do aparecimento de casos humanos nessa regiao.

Ressalta-se a confirmação que tais resultados parecem trazer à hipótese de Carlos Chagas, que pensava ser esta doença primitivamente silvestre, com posterior adaptação aos animais domésticos e ao homem.

SUMMARY

1) The epidemiology of Chagas' disease was studied for the first time in a systematized work, in a district of the region of the Amazon estuary, whose ecological conditions differ from those encountered in other zones where similar researches have been made.

2) At the place chosen for the studies — Aurá — a locality about 10 kms from Belem (State of Pará), no human infection by *S. cruzi* has been found, either by blood examination or xenodiagnosis, both having been tried on all the inhabitants (117 people); nor was there any symptomatology attributable to the disease.

3) Out of the six xenodiagnoses made on domestic animals (five dogs and one cat), only one dog was found infected. This animal belonged to the house where the greatest infestation by triatomid bugs with a high index of infection was verified. However, for the reasons given in the text, the hypothesis that the dog might have become infected by eating organs of infected wild animals has been suggested.

4) Of the 115 animals whose blood was examined in thick blood film, 9 (7,8%) proved to be infected by *Schizotrypanum*. Out of 47 xenodiagnoses carried out on wild animals, 15 (32.6%) showed positive results (11 opossums, 3 ant-eaters, 1 armadillo). The ant-eater *T. tetradactylus* is a new vertebrate-host of *Schizotrypanum*.

5) During 11 months of research, each house being inspected at least once every fortnight, triatomid bugs were found in 7 out of the 36 houses of the village. The 39 specimens collected were all adults; an exhaustive search did not reveal the existence of any young insects in the houses. According to their order of frequency, the species found were the following: *P. geniculatus* (29 specimens, 7 infected), *R. pictipes* (9 specimens, 2 infected) and *E. mucronatus* (1 uninfected specimen). The great majority of the insects was captured during the second half of the year (summer period).

6) In the very midst of the forest, in the hole of an ant-eater (*T. tetradactylus*), larvae, nymphs and adults of *P. geniculatus* were found. The house nearest to the hole presented the highest index of infestation by this bug (22 specimens, all in adult stage). In the hole of *Potus flavus* ("ma-

caco da noite") a triatomid larva and an adult *Panstrongylus rufotuberculatus* have been found.

7) Strains of *Schizotrypanum* isolated from wild animals showed a weak virulence. The dog strain, although easily infecting laboratory animals, differs from the typical human strains, as DIAS and FREITAS proved in their biometrical studies.

8) The results above mentioned are discussed in the paper and, in view of the habits of the insect vectors and the prevalence of infected wild animals, the sylvan nature of Chagas' disease in Aurá is concluded. Although human cases have not been detected, the possibility of human infection in this region is admited, since a domestic animal (a dog) was found to be infected (possibly through the way of the insect vector).

Attention is drawn to the confirmation such results seem bring CARLOS CHAGAS' hypothesis, that this disease was at first found in wild animals, and could later on spread to domestic animals and man.

REFERÊNCIAS

CASTRO FERREIRA, L. & DEANE, L.

1938 — Novo depositário silvestre do *S. cruzi* (Chagas, 1909): a irára (*Tayra barbara* L.). Nota prévia. Brasil Med. *52* (52):1159-1161.

CASTRO FERREIRA, L. & DEANE, L.

1938 — Infecção experimental do *Rhodnius pictipes* STAL, 1872, pelo *S. cruzi*. Nota prévia. Brasil Med., *52*(49):1093.

CHAGAS, C.

1912 — Sobre um trypanosoma do tatú (*Dasypus novemcinctus*, LATREILLE, 1811). Possibilidade de ser o tatú um depositário do *T. cruzi* no mundo exterior. (Nota prévia). Brasil med. *26*(30):305-306.

CHAGAS, C.

1924 — Infection naturelle des Singes du Para par *Trypanosoma cruzi*. C. R. Soc. Biol. *90*:873.

CHAGAS, E. & COLABORADORES

1938 — Leishmaniose Visceral Americana (Relatório dos trabalhos realizados pela comissão encarregada do estudo da L.V.A. em 1937). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz *33*(1):89-229.

CLARK, H. C. & DUNN, L. H.

1932 — Experimental studies on Chagas' disease in Panama. Am. Jl. Trop. Med. *12*(1):49-77.

DEANE, L. & JANSEN, G.

1939 — Encontro do *S. cruzi* (CHAGAS 1909) em Marsupiais da espécie *Marmosa cinerea*, Desmarest. Nota prévia. Brasil Med. *53*(7):265-266.

DIAS, E.

1940 — Sobre um *Schizotrypanum* dos morcegos *Lonchoglossa ecaudata* e *Carollia perspicillata* do Brasil. Mem. Ins. Oswaldo Cruz *35*(2):399-409.

DIAS, E.

1940 — Transmissão do *Schizotrypanum cruzi* entre vertebrados pela via digestiva. Brasil Med. *54*(47):775.

MARTINS, A. V., VERSIANI, V. & TUPINAMBÁ, A.

1940 — Estudos sobre a tripanosomiase americana em Minas Gerais. Mem Instituto Oswaldo Cruz *35*(2):285-301.

NATTAN-LARRIER, L.

1921 — Inféctions à trypanosomes et voies de pénétrations des virus. Bull. Soc. Pat. Ex. *14*:537-542.

SOUZA ARAUJO, H. C.

1922 — A prophylaxia rural no Estado do Pará vol. 1 : 190. Tip. da Livraria Gillet, Belem.

ESTAMPA 2

Fig 5 — Tronco de um exemplar de "tauarí" da floresta do Aurá.

Fig. 6 — Exemplar de tatú (*Dasypus novemcinctus*) encontrado infetado pelo *S. cruzi*.

Fig. 7 — Exemplar de tamanduá (*T. tetradactylus*), outro depositário silvestre de *Schizotrypanum*.

Fig 8 — Cão ("Ligeiro"), encontrado infetado espontaneamente pelo *S. cruzi*.

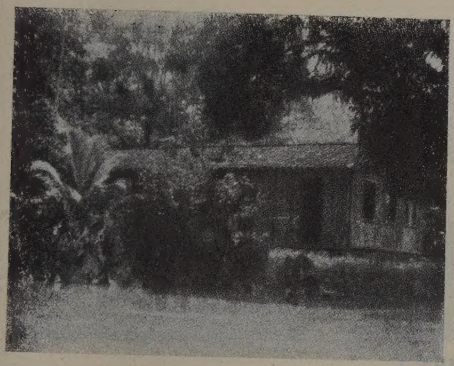
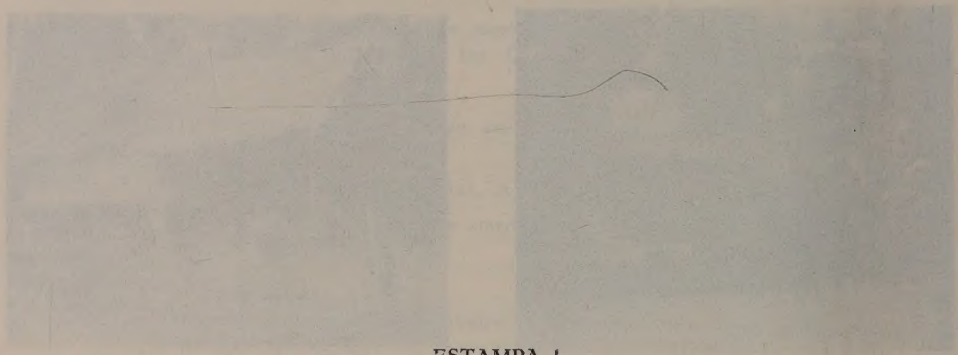


Figura 1

Figura 2

Figura 3

Figura 4



ESTAMPA I

Figs. 1 e 2 — Tipo de habitação da várzea na zona estudada. Na casa da fig. 2 foi capturado *Rhodnius pictipes*.

Figs. 3 e 4 — Tipo de habitação da terra firme na zona estudada. A fig. 4 mostra a casa 1, onde funcionava o posto de Serviço e que era a antiga séde do Destacamento Militar. Esta casa foi a que apresentou maior infestação por Triatomideos (*Panstrongylus geniculatus*), e nela foi encontrado um cão infectado.

Figura 5

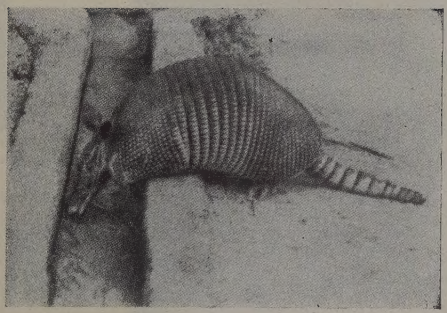


Figura 6

Figura 7

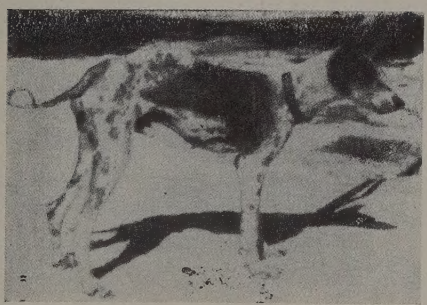
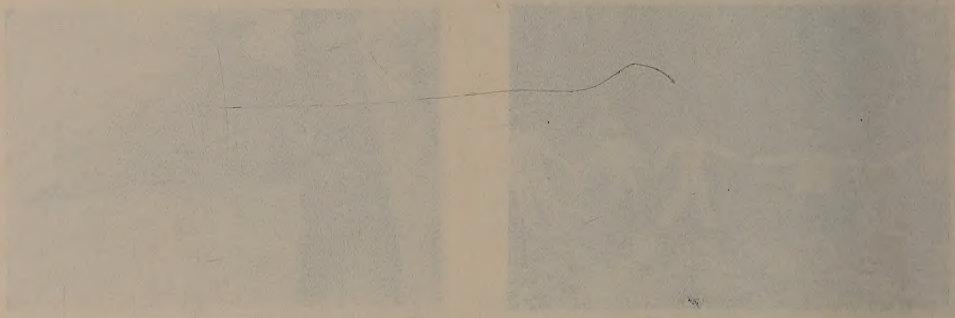


Figura 8



IMPRENSA NACIONAL
RIO DE JANEIRO — 1942